

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. Jens Werner

**Auswirkungen des extranodalen Lymphknotenwachstums beim Magenkarzinom auf die
Prognose und dessen Zusammenhang mit molekularen Markern.**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Helena Link

aus
Dachau

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Martin K. Angele

Mitberichterstatter: PD Dr. Sophia Horster
Prof. Dr. Hans Arnholdt

Mitbetreuung durch
den promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Dr. Jens Neumann

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 21.02.2019

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Einleitung..... | 6 |
| 1.1 | Magenkarzinom - ein Überblick | 6 |
| 1.1.1 | Epidemiologie, Prognose und Histomorphologie des Magenkarzinoms | 6 |
| 1.1.2 | Stadieneinteilung des Magenkarzinoms- TNM und UICC | 6 |
| 1.2 | Extrakapsulärer Lymphknotenbefall | 7 |
| 1.2.1 | Der Begriff des extranodalen Wachstums..... | 7 |
| 1.2.2 | ECG vs. ICG- Indikator für Prognose und Aggressivität? | 7 |
| 1.3 | Biomarker | 8 |
| 1.3.1 | Diskutierte Mechanismen der Zellproliferations-Beeinflussung beim Gastrointestinalen Tumor | 8 |
| 1.3.2 | Einführung in die verwendeten Marker | 10 |
| a. | MLH1 und MSH2 | 11 |
| b. | Beta-Catenin | 12 |
| c. | CD 133 | 14 |
| d. | SOX2 | 14 |
| e. | SOX9 | 15 |
| 2 | Fragestellung und Zielsetzung..... | 16 |
| 2.1 | Extranodales vs. intranodales Wachstum und Histomorphologie | 16 |
| 2.2 | Assoziation des ECG mit Biomarkern | 16 |
| 2.3 | Identifikation von Prognosefaktoren | 16 |
| 3 | Material und Methoden | 17 |
| 3.1 | Studiendesign | 17 |
| 3.2 | Charakterisierung des Patientenkollektivs..... | 18 |
| 3.2.1 | Überblick..... | 18 |
| 3.2.2 | Klinische Charakteristika | 20 |
| 3.2.3 | Histomorphologie..... | 22 |
| 3.2.4 | Extranodales Wachstum..... | 25 |
| 3.3 | Biomarker | 26 |
| 3.3.1 | Allgemeines | 26 |
| 3.3.2 | MLH1 | 28 |
| 3.3.3 | MSH2 | 28 |
| 3.3.4 | Beta Catenin | 28 |
| 3.3.5 | CD133 | 29 |
| 3.3.6 | SOX2 | 29 |
| 3.3.7 | SOX9 | 30 |
| 3.4 | Statistik..... | 30 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4 | Ergebnisse..... | 31 |
| 4.1 | Histomorphologie..... | 31 |
| 4.1.1 | Einfluss der histomorphologischen Parameter auf das Überleben..... | 31 |
| a. | N-Stadium..... | 31 |
| b. | T-Stadium | 32 |
| c. | UICC Stadium..... | 33 |
| d. | ECG vs ICG gesamt..... | 35 |
| e. | UICC3- ECG vs. ICG..... | 36 |
| f. | UICC2 ECG vs. ICG | 37 |
| 4.1.2 | Zusammenhang der histomorphologischen Parameter mit dem ECG..... | 38 |
| a. | TNM-Stadium und ECG..... | 38 |
| b. | Abhängigkeit des ECG vom Vorhandensein einer Lymphangiosis carcinomatosa..... | 39 |
| c. | Abhängigkeit des ECG vom Grading des Tumors und vom Resektionsrand | 40 |
| d. | Abhängigkeit des ECG von der Lauren-Klassifikation | 41 |
| e. | Anteil des ECG in Abhängigkeit vom Regressionsgrad nach Becker | 41 |
| 4.2 | Biomarker | 42 |
| 4.2.1 | Auswertung der Immunhistochemie..... | 42 |
| a. | MLH1 | 42 |
| b. | MSH2 | 44 |
| c. | Beta Catenin | 45 |
| d. | CD133 | 47 |
| e. | SOX2 | 49 |
| f. | SOX9 | 51 |
| 4.2.2 | Immunhistochemische Marker und extranodales Wachstum sowie deren Einfluss auf das Überleben | 53 |
| a. | MLH1 | 53 |
| b. | MSH2 | 55 |
| c. | Beta Catenin | 55 |
| d. | CD133 | 57 |
| e. | SOX2 | 60 |
| f. | SOX9 | 62 |
| 5 | Diskussion..... | 65 |
| 5.1 | Repräsentativität des Kollektivs | 65 |
| 5.2 | Extrakapsuläres Wachstum- ein wichtiger Parameter für das Magenkarzinom..... | 66 |
| 5.3 | Extrakapsuläres Wachstum und Biomarker | 68 |
| 5.4 | Limitationen der Studie | 69 |

| | | |
|-----|--|----|
| 5.5 | Klinische Relevanz | 69 |
| 6 | Ausblick – Therapie des Magenkarzinoms in Gegenwart und Zukunft..... | 70 |
| 6.1 | Überblick über die aktuelle leitliniengerechte Therapie der primär resektablen Magenkarzinome..... | 70 |
| 6.2 | Perioperative Therapieschemata | 71 |
| 6.3 | Therapieindividualisierung | 72 |
| 7 | Zusammenfassung..... | 73 |
| 8 | Literatur | 75 |
| 9 | Eigene Veröffentlichungen..... | 79 |
| 10 | Abkürzungen..... | 80 |
| 11 | Abbildungen | 83 |
| 12 | Tabellen | 88 |
| 13 | Danksagung | 89 |

1 Einleitung

1.1 Magenkarzinom - ein Überblick

1.1.1 Epidemiologie, Prognose und Histomorphologie des Magenkarzinoms

Im Jahr 2012 erkrankten weltweit 951.600 Menschen an Magenkrebs [1]; 723.100 starben daran [2]. Jährlich erkranken in Westeuropa 8,8 Männer und 4,3 Frauen pro 100 000 Einwohner an Magenkrebs [2]. Eine weitaus höhere Inzidenz wird in Ostasien, vor allem in Korea, Japan und China beobachtet. Hier liegt die jährliche Neuerkrankungsrate bei 35,4 Männern und 13,8 Frauen pro 100.000 Einwohner [2]. Damit ist Magenkrebs insgesamt das fünfthäufigste Karzinom [2].

Der Häufigkeitsgipfel des Erkrankungsalters liegt jenseits des 50. Lebensjahres [3] - das mediane Erkrankungsalter liegt bei 72 Jahren für Männer und bei 77,5 Jahren für Frauen [4] - doch in 10% der Fälle erkranken Patienten auch schon zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr [3].

Das Magenkarzinom weist wenige spezifische Frühsymptome auf. Dies hat zur Folge, dass mehr als die Hälfte der Patienten bei Diagnosestellung bereits an einem fortgeschrittenen Tumorstadium leidet [5], was die Prognose drastisch verschlechtert. Unter Männern stellt es – nach Lungen- und Leberkrebs- die dritthäufigste krebsassoziierte Todesursache dar, unter Frauen die fünfthäufigste [2].

So haben kleine Karzinome ohne Lymphknoten- und Fernmetastasen (T1 N0 M0, UICC IA) eine 5-Jahres-Überlebensrate von bis zu 90%, während es ab einem UICC Stadium II nur noch knapp 50% sind. Karzinome im UICC Stadium III weisen eine 5-Jahres-Überlebensrate von rund 30% auf, im Stadium IV sind es nur noch 5% [1] (Stadieneinteilung vgl. Tabelle 1).

Den wichtigsten Risikofaktor für das Magenkarzinom stellt die Infektion mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* dar. Nach einer Infektion entsteht zunächst eine Gastritis, aus der sich eine Schleimhaut-Atrophie und schließlich eine intestinale Metaplasie entwickeln. Aus dieser wiederum entstehen dysplastische Zellen, welche letztlich zum Karzinom entarten [6]. Das Bakterium wird als Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines Magenkarzinoms angesehen und ist in 77% der nicht in der Kardiala lokalisierten Magenkarzinome nachweisbar [7]. Das Risiko der Entstehung eines Magenkarzinoms ist bei Infektion mit *Helicobacter pylori* neunfach erhöht [8].

Nach der Lauren-Klassifikation wird der intestinale (50% der Karzinome) vom diffusen Typen (ca. 40%) unterschieden. Ersterer wächst vornehmlich drüsig formiert, während der diffuse Typ unzusammenhängend und einzeln zellig wächst. Dadurch ist er schlechter begrenzt und neigt leichter zur Magenwandinfiltration als der intestinale Typ [3].

1.1.2 Stadieneinteilung des Magenkarzinoms- TNM und UICC

In der Onkologie wird grundsätzlich die TNM-Klassifikation verwendet. Aus den T-, N- und M-Kategorien nach der TNM-Klassifikation ergibt sich das UICC-Stadium. Die T-Kategorie gibt Informationen über die Größe des Primärtumors, die N-Kategorie über die Anzahl der Lymphknotenmetastasen und die M-Kategorie über das Vorhandensein von Fernmetastasen. Für das Magenkarzinom hat sich zusätzlich das UICC-Stadium etabliert. Es stellt eine klinisch-pathologische Einteilung dar, welche zusätzliche Hinweise für die Therapieplanung und die Prognose gibt. Die nachfolgende Tabelle gibt einen kurzen Überblick über die Einteilungen.

| UICC-Stadium | TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms |
|---------------------|---------------------------------------|
| Stadium 0 | Tis (Carcinoma in situ) |
| Stadium IA | T1 N0 M0 |
| Stadium IB | T1 N1 M0 |
| | T2 N0 M0 |
| Stadium II | T1 N2 M0 |
| | T2 N1 M0 |
| | T3 N0 M0 |
| Stadium IIIA | T2 N2 M0 |
| | T3 N1 M0 |
| | T4 N0 M0 |
| Stadium IIIB | T3 N2 M0 |
| Stadium IV | T1-3 N3 M0 |
| | T4 N1-3 M0 |
| | Tx Nx M1 (jede Fernmetastasierung) |

Tab. 1: Zusammenhang von TNM- und UICC-Klassifikation beim Magenkarzinom [1].

1.2 Extrakapsulärer Lymphknotenbefall

1.2.1 Der Begriff des extranodalen Wachstums

Unter extranodalem oder extrakapsulärem Wachstum, kurz ECG, versteht man den Durchbruch der Lymphknotenkapsel mit nachfolgender Ausbreitung einer Lymphknotenmetastase in das umgebende Weichgewebe. Bei der Diagnostik eines potentiell extranodalen Lymphknotens ist vor allem die Unterscheidung wichtig, ob die Tumorzellen vom Weichgewebe aus in den benachbarten Lymphknoten einwachsen, oder ob das Geschehen primär von innerhalb der Lymphknotenkapsel ausgeht und sich von dort in das umliegende Weichgewebe ausbreitet. Dies ist anhand einzelner histologischer Schnittebenen nicht immer eindeutig zu erkennen und muss dann anhand weiterer Präparate nachvollzogen werden. Auch darf das Vorliegen eines extranodalen Befalles nicht mit einer Lymphgefäßinvasion gleichgesetzt werden. Bei der Lymphangiosis carcinomatosa bleiben die Tumorzellen innerhalb der Lymphgefäße und sind somit, anders als bei der extranodalen Ausbreitung, noch durch ein Endothel der Lymphgefäße vom umliegenden Weichgewebe abgetrennt.

1.2.2 ECG vs. ICG- Indikator für Prognose und Aggressivität?

Es gibt bereits Anhaltspunkte dafür, dass das Vorhandensein eines extrakapsulären Lymphknotenbefalles einen Einfluss auf das Überleben hat und unter anderem auch mit dem TNM Stadium korreliert:

Eine Gruppe koreanischer Forscher veröffentlichte im November 2014 eine Studie über das extranodale Wachstum beim Lymphknoten-metastasierten Magenkarzinom und dessen Auswirkung auf die Prognose. Untersucht wurden dabei 1143 Patienten, welche im Rahmen ihrer Krebserkrankung eine Gastrektomie und Lymphadenektomie erhalten hatten. Sie fanden einen signifikanten Unterschied in der 5-Jahres-Überlebensrate (48,1% bei extranodalem Wachstum vs. 78,2% bei nicht extranodalem Wachstum, $p < 0,001$) und eine Assoziation von extranodalem Wachstum mit einem fortgeschrittenen T- und N-Stadium, Vorhandensein einer Lymphangiome und der Tumorgroße [9].

Das Vorhandensein eines extranodal befallenen Lymphknotens stellt somit einen potentiellen Prognoseparameter für das Magenkarzinom dar.

Beim kolorektalen Karzinom wird dieser Parameter bereits umfassender diskutiert. So veröffentlichten Veronese et al im Januar 2016 eine Metaanalyse über 13 Studien bis einschließlich 7. Januar 2015. Betrachtet wurden insgesamt 1336 Patienten mit kolorektalen Karzinomen und Lymphknotenbefall. Die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs sowie die Gesamtmortalität waren bei den Fällen mit extranodalem Wachstum signifikant erhöht [10]. Die Autoren implizieren die Berücksichtigung des ECG als wertvollen prognostischen Parameter beim kolorektalen Karzinom.

Wind et al gehen in ihrer im Jahr 2007 veröffentlichten Rezension noch einen Schritt weiter; betrachtet wurden insgesamt 14 Studien über das Magen-, Ösophagus- und Rektumkarzinom. Sie kamen letztlich zu dem Ergebnis, das ECG für Karzinome des gesamten Gastrointestinaltraktes als Prognoseparameter zu berücksichtigen [11].

Letztlich deutet die Assoziation einer Kapselüberschreitung mit schlechterem Gesamtüberleben und fortgeschrittenem Tumorstadium aber auch darauf hin, dass Tumore mit kapselüberschreitendem Wachstum ein deutlich aggressiveres Wachstumsmuster aufweisen als Karzinome mit kapselrespektierendem Lymphknotenbefall. Es stellt sich folglich die Frage: Ist der Parameter des extrakapsulären Lymphknotenwachstums ein Indikator für die Tumoraggressivität des Magenkarzinoms?

1.3 Biomarker

1.3.1 Diskutierte Mechanismen der Zellproliferations-Beeinflussung beim Gastrointestinalen Tumor

Die Einteilung des Magenkarzinoms nach morphologischen Parametern ist über die TNM-Einteilung hinaus mittels der Lauren-Klassifikation gegeben und im klinischen Alltag etabliert. Die Frage nach Unterschieden der Tumore auf zellulärer und molekularer Ebene ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

Multiple genetische und epigenetische Alterationen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen werden diskutiert, aber auch Zellzyklus-regulierenden Proteine, Zelladhäsionsmoleküle, DNA-Reparatur Gene, genetische Instabilität oder Telomeraseaktivierung können zur Entstehung eines Magenkarzinoms führen.

Einen Einblick in aktuelle Forschungsergebnisse gibt das 2014 im Nature veröffentlichte TCGA'-Projekt („The Cancer Genome Atlas Project“). Zur molekularen Differenzierung der Magentumore wurden insgesamt 295 Patienten mit Adenokarzinom des Magens auf diverse genetische Alterationen untersucht. Letztlich kamen die Autoren zu folgender Einteilung der Magenkarzinome: Karzinome mit positivem Nachweis von Epstein-Barr-Virus (EBV) (n=26), Mikrosatelliten-instabile Tumoren (MSI) (n=64), genetisch stabile Tumoren (GS) (n=58) und Karzinome mit chromosomaler Instabilität (CIN) (n=147) [12].

In den vier Gruppen fanden die Forscher unterschiedliche vorherrschende Mutationen und Alterationen. Die Darstellung gibt nur ansatzweise wieder, wie viele diverse Mechanismen an der Entstehung eines Magenkarzinoms beteiligt sein können.

| Typ | Vorherrschende Veränderungen | Anmerkung zum veränderten Mechanismus |
|------------|-------------------------------------|---|
| EBV | PIK3CA-Mutationen, | Phosphatidylinositol-3-Kinase, |
| | DNA-Hypermethylierung (CIMP) | CpG Island Methylator Phenotype |
| | JAK2-Amplifikation | Tyrosin-Kinase, ist in einen Teil der Zytokin-Rezeptor-Signalwege involviert [13] |
| | PD-L1/PD-L2 Amplifikation | Die Liganden inhibieren bei Rezeptorbindung die T-Zellaktivierung und Zytokinproduktion. Tumorzellen verhindern dadurch eine körpereigene Immunantwort [14]. |
| | CDKN2A (=p16) | Tumorsuppressorgen, welches durch Inhibition von CDKs den Zellzyklus am G1- oder G2- Kontrollpunkt arretiert |
| MSI | Mutationen in onkogenen Signalwegen | Mutationen wurden u.a. in folgenden Genen nachgewiesen: PIK3CA, ERBB2/3, EGFR, PTEN |
| | MLH1-Silencing | DNA-Mismatch-Reparatur-Protein, eine Mutation oder epigenetische Alteration hat eine Mikrosatelliteninstabilität zur Folge |
| GS | Diffuser Typ n. Lauren | |
| | RHOA-Mutationen | Ras homolog familiy member A; fungiert als GTPase, reguliert die Zellform, -adhäsion und -motilität [15] |
| | CDH1- Mutationen (=E-Cadherin) | Transmembranes Glykoprotein, an Epithelien exprimiert, wichtig für die Zell-Zell-Adhäsion. |
| CIN | RTK-Amplifikation | Rezeptor-Tyrosin-Kinasen |
| | TP53 Mutation | Tumorsuppressorprotein, reagiert auf diverse zelluläre Stressoren durch Expressionsregulation zahlreicher Zielgene, induziert dadurch den Zell Zyklus Arrest, Apoptose, Zellalterung und die DNA-Reparatur. [16]. |
| | Intestinaler Typ n. Lauren | |

Tab. 2: Überblick über die im TCGA-Projekt untersuchten Mutationen, sortiert nach den vier Subtypen des Magenkarzinoms

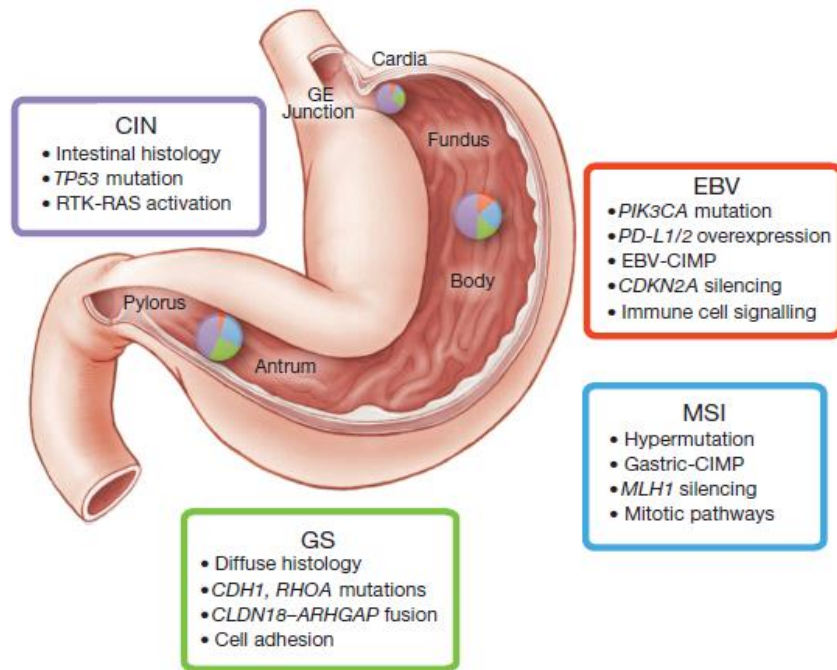


Abb. 1 [12]: Besonderheiten der Magenkarzinom-Subtypen. Das Schema stellt die wichtigsten Merkmale der vier molekularen Subtypen nach dem TCGA-Projekt dar. Die Verteilung der Subtypen nach der Lokalisation im Magen ist anhand der Kreisdiagramme dargestellt.

1.3.2 Einführung in die verwendeten Marker

Die im Rahmen des TCGA-Projektes veröffentlichte molekulare Unterteilung zieht seither weitere Forschungsarbeiten in Anlehnung an die Gruppierung nach sich [17] und ist daher auch eine gute Basis für die Auswahl einiger Marker für diese Studie. Drei der sechs ausgewählten Marker wurden in Anlehnung daran ausgewählt: *MLH1*, *MSH2* und β -Catenin. Unabhängig vom TCGA-Projekt wurden weitere drei Marker für diese Studie ausgewählt: *CD133*, *SOX2* und *SOX9*. Sie wurden ebenfalls bereits im Rahmen gastrointestinaler Tumore untersucht und dienen zur Identifikation tumorinitiierender Zellen. Diese sogenannten ‚Krebsstammzellen‘ (CSC) sind charakterisiert durch eine ausgiebige Fähigkeit zur Selbsterneuerung, weisen dadurch ein hohes Entartungs-Potential auf [18] und sind daher ein wichtiger Mittelpunkt der Krebsforschung [19]. Ein hoher Anteil an Krebsstammzellen im Primärtumor ist mit einer vermehrten Chemotherapie-Resistenz [20, 21], schlechterer Prognose [22] und fortgeschrittenem Tumorstadium [23] assoziiert, was darauf hinweist, dass Krebsstammzellen ein Zeichen für einen aggressiv wachsenden Tumor-Subtyp darstellen.

Auch beim Magenkarzinom wird die Rolle der ‚Krebsstammzellen‘, kurz CSC, bei der Tumorentstehung weiterhin untersucht und als mögliches Therapieziel angesehen [24]. Die CSC-Population wird auch bei Patienten mit Magenkarzinom oftmals für die hohe Rezidivrate und subsequente Therapieresistenz verantwortlich gemacht [25].

Alle hier untersuchten Marker besitzen somit die Eigenschaft, aggressive Karzinom-Subgruppen zu demaskieren.

| Marker | Funktion | Rolle beim Magenkarzinom |
|-------------------|---|--|
| MLH1, MSH2 | Proteine der DNA-Mismatch-Reparatur (MMR), Mutationen mit Verlust der Reparaturfunktion führen zur Mikrosatelliteninstabilität (MSI). | Magenkarzinome mit nachgewiesener Mikrosatelliteninstabilität sind häufiger bei älteren Patienten. Sie weisen weniger häufig Lymphknotenmetastasen auf [26]. MLH1 wurde im TCGA-Projekt vermehrt in der MSI-Gruppe nachgewiesen [12]. |
| β-Catenin | Proto-Onkogen, als Teil des Wnt-Signalwegs Vermittlung der Genexpression proliferationsfördernder Gene. | Eine geringe β-Catenin Expression ist mit geringer Tumorzellinvasion und weniger Lymphknotenmetastasen assoziiert [27]. |
| CD133 | Genaue Funktion unbekannt, vermehrt exprimiert in Tumor-initiiierenden Zellen | Die CD133 Überexpression korreliert beim Magenkarzinom unter anderem mit einer schlechteren Prognose und vermehrtem Auftreten von Lymphknoten- und Fernmetastasen [18]. |
| SOX2 | Transkriptionsfaktoren, die die embryonale Entwicklung regulieren und das Zellschicksal bestimmen. Die Genprodukte sind wichtig für die Aufrechterhaltung von Stammzellen im ZNS und für die Genexpression im Magen [28]. | Eine hohe SOX2-Expression bei Patienten mit Magenkarzinom geht mit einem besseren Behandlungsergebnis und mit geringeren Lymphknotenmetastasen einher. Außerdem inhibiert SOX2 die Tumorzellinvasion durch Vermehrung der p21 Expression [29]. |
| SOX9 | Transkriptionsfaktor, physiologisch u.a. wichtig für die Chondrozytendifferenzierung und die Differenzierung der männlichen Geschlechtsorgane, indem es die Transkription des Anti-Müller-Hormons reguliert [30]. | Die SOX9-Expression ist beim Magenkarzinom unter anderem mit vermehrten Lymphknoten- und Fernmetastasen, fortgeschrittenem Tumorstadium und mit schlechterem Überleben assoziiert [31]. |

Tab. 3: Überblick über die in dieser Studie untersuchten Alterationen mit zellulärer Funktion und Rolle beim Magenkarzinom

a. MLH1 und MSH2

Die beiden Marker MLH1 und MSH2 sind Mikrosatelliteninstabilitäts-Marker und physiologisch ein Teil der DNA-Reparatur. Mikrosatelliteninstabilität bezeichnet eine Längenveränderung der kurzen, repetitiven DNA-Sequenzen als Folge der Replikation. Normalerweise wird eine solche Veränderung durch DNA-Reparaturmechanismen während der Replikation verhindert. Ein bedeutender Reparaturmechanismus, der dabei eine Rolle spielt, ist die DNA-Mismatch-Reparatur (MMR). Ist eine Mutation im Bereich der MMR-Gene vorhanden, hat dies eine geringere Expression der daraus entstehenden MMR-Proteine zur Folge; die DNA-Reparatur ist defekt und die Mikrosatelliteninstabilität kann nicht mehr suffizient repariert werden. Ziel der MMR-Proteine ist es, während der DNA-Replikation eine Fehlpaarung in DNA-Doppelsträngen zu erkennen und zu entfernen. Die Mismatch-Proteine sind hierbei für das Erkennen und die Inzision der falschen Basen verantwortlich, das eigentliche Herausschneiden wird von speziellen Exonukleasen (EXO1) übernommen (vgl. hierzu auch Abbildung 2 mit Bildunterschrift). Bei den humanen MMR-Proteinen unterscheidet man fünf MutS-Homologe, darunter auch MSH2, und drei MutL-Homologe, zu welchen MLH1 zählt [32].

Die beiden Mikrosatelliteninstabilitäts-Marker MLH1 und MSH2 wurden in Anlehnung an das TCGA-Projekt ausgewählt. In der MSI-Gruppe wurde dort neben diversen vorherrschenden Mutationen in onkogenen Signalwegen auch ein Verlust der MLH1-Expression festgestellt [12]. Ein MSH2-Verlust äußert sich ebenfalls in einer Mikrosatelliteninstabilität. Ein MLH1- bzw. MSH2-Verlust ist vor allem bei hereditären Formen des Magenkarzinoms im Rahmen eines HNPCC-Syndroms nachweisbar [33]. Im Rahmen von epigenetischen Alterationen kann der Verlust der MLH1- bzw. MSH2-Expression aber auch bei sporadischen Karzinomen vorkommen [12].

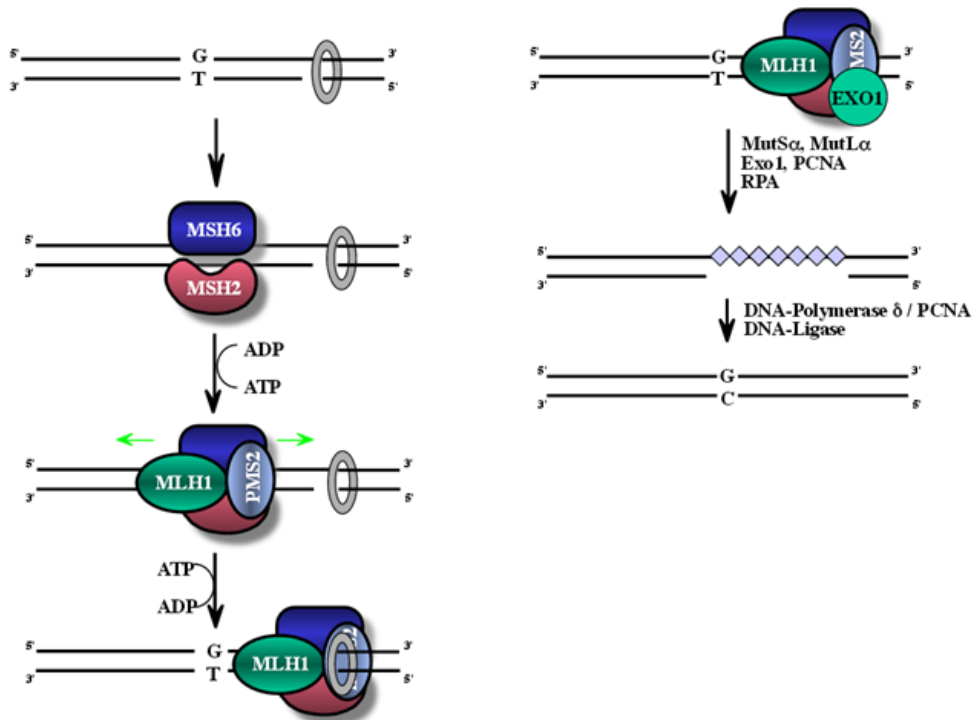


Abb. 2 [34]: MSH2 bildet zusammen mit MSH6 den Mismatch-Erkennungskomplex. Dieser bindet am Fehlpaar und rekrutiert MLH1 und PMS2. Der Komplex wandert dann an der DNA entlang, bis er eine Strangdiskontinuität im neu-synthetisierten Tochterstrang erkennt. EXO1 wird rekrutiert, anschließend wird der Tochterstrang bis nach dem falsch eingebauten Nukleotid abgebaut. Die Lücke wird anschließend regulär von der DNA-Polymerase δ aufgefüllt und die Enden durch die DNA-Ligase verknüpft.

b. Beta-Catenin

β -Catenin ist ein intrazelluläres Protein und ein Proto-Onkogen. Neben seiner Funktion als Zelladhäsionsmolekül ist β -Catenin außerdem ein wichtiger Bestandteil des Wnt-Signalwegs [35].

Wnt ist ein extrazellulärer Wachstumsfaktor, welcher physiologisch vor allem in der Embryogenese, dort unter anderem in der Bildung der Körperachse oder bestimmter Organanlagen eine Rolle spielt [36].

Der Wnt-Signalweg wirkt letztlich über die Stabilisierung bzw. Anreicherung von intrazellulärem β -Catenin. Ist kein Wnt-Ligand vorhanden, wird das zytoplasmatische β -Catenin durch einen Proteinkomplex aus der Glycogen Synthase Kinase 3β (GSK 3β), Axin und APC phosphoryliert. GSK 3β phosphoryliert β -Catenin und markiert es damit für die Ubiquitinierung

und den proteosomalen Abbau [37] (vgl. Abbildung 3, rechte Seite).

Bindet ein Wnt-Ligand an den Frizzled-Rezeptor (Fzd) und an einen der beiden Co-Rezeptoren LRP-5 bzw. LRP-6, wird nachfolgend das intrazelluläre Protein ‚Dishevelled‘ (Dvl) phosphoryliert. Dieses inhibiert in phosphoryliertem Zustand die GSK3 β ; β -Catenin wird folglich nicht phosphoryliert und nicht durch das Proteasom abgebaut. Das angereicherte β -Catenin wird nachfolgenden in den Zellkern transportiert, wo es zusammen mit Tcf (‚T-cell factor‘) und Lef (‚lymphoid enhancer-binding factor‘) die Expression bestimmter Zielgene wie Cyclin D1, Axin2, c-Myc und PPAR δ reguliert [37-39] (vgl. Abbildung 3, linke Seite).

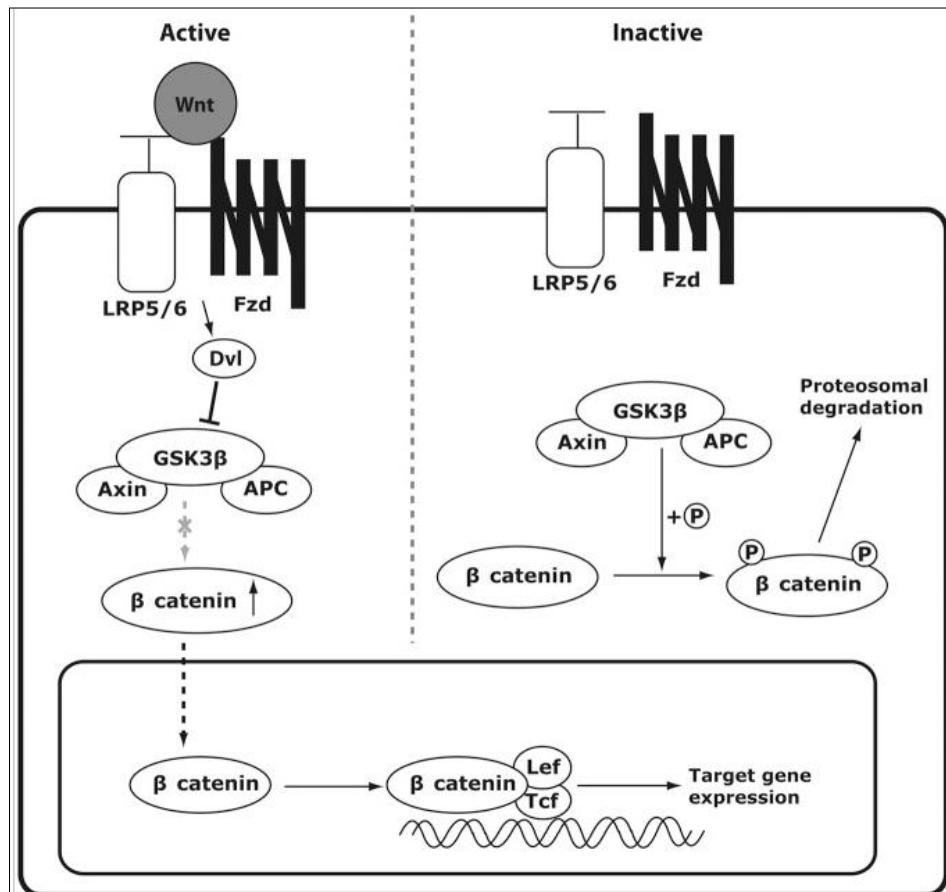


Abb. 3[40]: Wnt-Signalweg. Active: Ist der Wnt-Ligand am Frizzled (Fzd)-Rezeptor und an einem der Corezeptoren LRP5/6 gebunden, wird ‚Dishevelled‘ (Dvl) aktiviert, welches folglich GSK3 β inhibiert. β -Catenin wird nicht phosphoryliert und reichert sich intrazellulär an. Es wird dadurch in den Zellkern überführt, wo es zusammen mit den Transkriptionsfaktoren Lef und Tcf die Expression der Zielgene antreibt.

Inactive: Bei abwesendem Wnt-Liganden phosphoryliert GSK3 β β -Catenin stetig, was zur Ubiquitinierung und zum proteosomalen Abbau von Beta-Catenin führt. Folglich werden die Zielgene geringer exprimiert [40].

In Tumorzellen kann der Wnt-Signalweg auch ohne Ligandenbindung aktiviert werden. So kann beispielsweise durch eine ‚loss-of-function‘-Mutation eines Proteins des Proteinkomplexes aus GSK3 β , APC und Axin selbiger nicht mehr funktionieren und folglich β -Catenin nicht mehr abgebaut werden. Die Folge wäre eine stetige Aktivierung der davon abhängigen Transkriptionsfaktoren.

Dies ist bei der familiären adenomatösen Polyposis, kurz FAP, der Fall. Hier ist der

Tumorsuppressor APC betroffen; der ‚destruction-complex‘ kann nicht mehr gebildet und β -Catenin nicht mehr abgebaut werden. Die stetige β -Catenin-Erhöhung hat eine konstitutive Transkription der davon abhängigen Gene zur Folge, welche eine große Rolle bei der Regulation des Zellzyklus spielen und proliferationsfördernd wirken. Eine Mutation in diesem Bereich kann somit zur Krebsentstehung beitragen. Die abnormale Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs spielt sowohl für die Entstehung als auch für den Verlauf des Magenkarzinoms eine Rolle [41].

β -Catenin wird durch zahlreiche zelluläre Mechanismen in seiner nukleären Anreicherung beeinflusst [40]. So wird es beispielsweise von EGFR über den PI3K/Akt-Signalweg aktiviert [42] und steht damit in Zusammenhang zu den Alterationen, welche im TCGA-Projekt untersucht wurden. Dort wurden in der Gruppe der chromosomal instabilen Tumore (CIN) unter anderem vermehrt Alterationen von EGFR und in den EBV-positiven Karzinomen Mutationen des PI3K-Signalwegs gefunden [12].

Außerdem konnte eine fehlende β -Catenin Expression beim Magenkarzinom mit geringerer Tumorinvasionsrate, verminderter Zellproliferation und geringerer Metastasierung assoziiert werden [43].

Eine nukleäre Erhöhung der β -Catenin Konzentration wird beim Magenkarzinom auch mit einer *Helicobacter pylori*-Infektion in Verbindung gebracht. Die Infektion mit dem Bakterium soll dabei den Wnt-Signalweg stimulieren und über β -Catenin die epitheliale Zellproliferation der Magenschleimhaut steigern [44].

c. CD 133

Das Glykoprotein CD133, auch Prominin genannt, ist ein Transmembranprotein, dessen primäre Funktion nach wie vor ungeklärt ist. Es wurde erstmals 1997 in humanen hämatopoetischen Stammzellen nachgewiesen [45]. In den darauffolgenden Jahren wurde CD133 als Marker zur Identifikation Tumor-initiierender Zellen, den bereits erwähnten ‚Krebs-Stammzellen‘, etabliert [46, 47]. Diese Zellen sind vor allem dadurch charakterisiert, dass sie eine ausgeprägte Fähigkeit zur Selbsterneuerung haben. Heute ist CD133 ein in der Forschung häufig verwendeter Marker, um solche zu identifizieren [18].

Sowohl beim Magen- als auch beim kolorektalen Karzinom konnte eine vermehrte CD133-Expression mit einer schlechteren Prognose assoziiert werden [18, 48]. Beim Magenkarzinom wurde zusätzlich ein vermehrtes Auftreten von Lymphknotenmetastasen bei Karzinomen mit hoher CD133 Expression nachgewiesen [18].

d. SOX2

SOX2 ist ein bekannter Transkriptionsfaktor, welcher essentiell für die Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung undifferenzierter embryonaler Stammzellen ist. Er spielt zusammen mit einer Gruppe anderer Transkriptionsfaktoren wie c-Myc, LKF4 oder Oct3/4 eine Rolle bei der Induktion und Aufrechterhaltung pluripotenter Stammzellen [49-52].

SOX2 wird in gesunder Magenschleimhaut exprimiert, allerdings nicht in gesunder Darmschleimhaut. Im Magen ist SOX2 zuständig für die Regulierung der Genexpression [28].

Obwohl SOX2 auf Stammzellen des Magens exprimiert wird [53] und eine Expression in vielen Tumoren wie dem spinözellulären Karzinom [54, 55], dem Ewing-Sarkom [56], dem Prostata-

und Mamma-Karzinom [49, 57] eine tumorfördernde Wirkung nach sich zieht, gilt dies offensichtlich nicht für das Magenkarzinom. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass anders als erwartet eine inverse Korrelation von SOX2 und Tumorgenese besteht. Ein Verlust der SOX2-Expression induzierte demnach unter anderem die Transkription der Tcf/Lef-abhängigen Gene und förderte somit die Tumorentstehung [53].

Auch beim Menschen scheint SOX2 beim Magenkarzinom als Tumorsuppressor zu fungieren [58]. Der im März 2016 im „American Journal of Cancer Research“ erschienene Artikel weist darauf hin, dass in einigen Studien eine reduzierte SOX2-Expression bei Patienten mit Magenkarzinom nachgewiesen wurde und diese mit einem schlechteren Outcome assoziiert war. Zusätzlich scheint auch eine Infektion mit *Helicobacter pylori*, welche als Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines Magenkarzinoms gilt, die SOX2-Expression zu supprimieren [58]. Patienten mit Magenkarzinom und geringer SOX2-Expression haben außerdem ein besseres Behandlungsergebnis; eine hohe SOX2 Expression ist mit einer geringeren Rate an Lymphknotenmetastasen assoziiert [29].

Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass SOX2 die Expression von β -Catenin reguliert [59-61], was den Marker für diese Studie noch interessanter macht.

e. SOX9

Der Transkriptionsfaktor SOX9 ist Teil der DNA-bindenden Proteine der HMG Domäne und ist wichtig für die Geschlechtsentwicklung des Mannes, indem es die Transkription des Anti-Müller-Hormon-Gens reguliert. Desweiteren spielt SOX9 eine entscheidende Rolle für die Chondrogenese, indem es die Expression der knorpelspezifischen Gene reguliert [30, 60, 62]. Im Gastrointestinaltrakt wird SOX9 in den Zellkernen der Kryptenepithelien einschließlich der Paneth- und Stammzellen exprimiert [62]. Es spielt außerdem eine wichtige Rolle für die Entwicklung des Endoderms sowie die Homöostase des intestinalen Epithels indem es unter anderem mit dem Wnt-Signalweg interagiert. Die Deletion von SOX9 führt zu einer Aktivierung des Wnt-Signalwegs und somit zu einer vermehrten epithelialen Proliferation und folglich einer intestinalen Hyperplasie [60, 63].

Es wurde festgestellt, dass SOX9 zusammen mit dem Wnt-Zielprotein Slug den Stammzellstatus von Mamma-Zellen determiniert. SOX9 und Slug induzieren die Passage von differenzierten luminalen Zellen durch die epitheliale mesenchymale Transition (EMT) und fördern somit direkt die maligne Progression und Metastasierung [64]. EMT spielt auch bei der Entstehung von gastrointestinalen Tumoren eine entscheidende Rolle [65, 66].

In gastrointestinalen Tumoren ist SOX9 mit einer schlechten Prognose und fortgeschrittenem Tumorstadium assoziiert [31, 67, 68]. Für das kolorektale Karzinom ist eine hohe SOX9 Expression ein unabhängiger Prognosefaktor [68]. Auch beim Magenkarzinom ist eine vermehrte Expression von SOX9 mit einer schlechteren Prognose, einem fortgeschrittenen Tumorstadium und dem vermehrten Auftreten von Lymphknoten- und Fernmetastasen assoziiert [31, 69].

2 Fragestellung und Zielsetzung

Der Faktor des extrakapsulären Wachstums stellt einen interessanten Parameter dar, der bislang weitgehend unerforscht ist. Dessen Zusammenhang sowohl mit histomorphologischen Parametern als auch mit zellulären Veränderungen der Karzinome muss genauer untersucht werden, um die Tumorbiologie dieser Subgruppe besser zu verstehen. Auch der Einfluss eines vorhandenen Kapseldurchbruchs auf das Überleben muss über die bereits bestehenden Anhaltspunkte hinaus genauer untersucht werden, um die Wichtigkeit des Parameters ‚ECG‘ einordnen zu können. Die drei wichtigsten Fragestellungen in Zusammenhang mit dem Parameter des extrakapsulären Wachstums sind somit folgende:

- 1 Zusammenhang des extrakapsulären Lymphknotenbefalls mit der Histomorphologie des Tumors
- 2 Assoziation des ECG mit Biomarkern
- 3 Prognosefaktor ECG als Voraussetzung für eine personalisierte Medizin

2.1 Extranodales vs. intranodales Wachstum und Histomorphologie

Der Parameter ‚extrakapsuläres Wachstum‘ soll auf eine Korrelation mit dem Überleben und der TNM-Klassifikation untersucht werden. Zusätzlich wird auch ein möglicher Zusammenhang von extrakapsulärem Lymphknotenbefall und Lymphgefäßinvasion, Tumorgrading und Lauren-Klassifikation untersucht. Für die neoadjuvant vortheraapierten Patienten soll außerdem der Regressionsgrad nach Becker in Zusammenhang mit dem ECG untersucht werden.

2.2 Assoziation des ECG mit Biomarkern

Da die beschriebenen Korrelationen des ECG mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium darauf hindeuten, dass Tumore mit extranodaler Überschreitung ein weitaus aggressiveres Wachstumsmuster aufweisen als Karzinome mit rein intrakapsulärem Lymphknotenbefall, stellt sich die Frage, ob auch auf zellulärer Ebene ein Unterschied zwischen den Tumoren der beiden Gruppen besteht.

Um die Karzinome mit kapselüberschreitendem Wachstum in ihrer Tumorbiologie besser verstehen zu können, werden sie auf einen Unterschied der Expression der Biomarker MLH1, MSH2, β -Catenin, CD133, SOX2 und SOX9 untersucht und dahingehend mit den Tumoren ohne Kapseldurchbruch verglichen.

Als Kontrolle dient eine Gruppe von 17 Patienten, deren Erkrankungen nach der TNM-Klassifikation als T3 oder T4 und N0 M0 klassifiziert wurden. Die Karzinome deuten auf ein wenig aggressives Wachstum hin, da sie trotz großer Primärtumoren keinen Anhalt für ein metastasierendes Wachstumsmuster aufweisen.

2.3 Identifikation von Prognosefaktoren

Der Parameter des extrakapsulären Wachstums der Lymphknoten stellt einen vielversprechenden Prognosefaktor dar. Unterscheiden sich die Tumore mit

kapselüberschreitendem Lymphknotenbefall auch auf zellulärer Ebene von den Karzinomen mit kapselrespektierendem Wachstum (unterscheiden sich die beiden Gruppen also auch auf tumorbiologischer Ebene) wäre dies letztlich ein Ansatzpunkt für eine zielgerichtete Therapie, um die Prognose der aggressiven Tumore mit Kapseldurchbruch zu verbessern.

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Die vorliegende klinisch-retrospektive Studie wurde an der chirurgischen Klinik und Poliklinik im Klinikum Großhadern der Ludwig Maximilian Universität München durchgeführt. Als Grundlage diente eine Datenbank mit insgesamt 529 Patienten mit Magen- oder AEG-Karzinom (Karzinom des Gastroösophagealen Übergangs), welche in den Jahren 2002 bis 2014 im Klinikum Großhadern eine Gastrektomie erhielten oder anderweitig dort behandelt wurden.

Aus diesem Patientenkollektiv wurden zunächst die nodal positiven Fälle ($n=260$) extrahiert. Von 199 der 260 nodal positiven Fälle konnten die histologischen Schnittpräparate vollständig gesammelt werden. Anhand dieser Präparate wurden die Fälle nach lichtmikroskopischer Beurteilung in die beiden Gruppen extrakapsuläres Wachstum (ECG) und intrakapsuläres Wachstum (ICG) eingeteilt.

Neben den histologischen Schnittpräparaten konnten einerseits anhand der ausgearbeiteten Datenbank wichtige Informationen zu den Patienten und den Tumoren gesammelt werden, zusätzlich wurden auch die Berichte des Pathologischen Instituts als Quelle für fehlende Informationen herangezogen.

Für die anschließenden immunhistochemischen Färbungen konnten von insgesamt 194 der 199 Fälle die notwendigen Paraffinblöcke der Primärtumore und Lymphknotenmetastasen gesammelt werden (vgl. 3.3 Biomarker). 187 der 194 Färbungen wurden anhand der Primärtumoren vorgenommen, für die restlichen 7 wurden aufgrund fehlender Primärtumor-Blöcke Präparate der Lymphknotenmetastasen verwendet.

Als Kontrollgruppe wurden zunächst aus derselben Datenbank mit 529 Patienten die als T3 oder T4 und N0 klassifizierten Fälle extrahiert ($n=27$). Da die Kombination aus großem Primärtumor und Fehlen von Lymphknotenmetastasen auf ein wenig aggressives Tumorwachstum hindeutet, waren die Fälle als Kontrollen für die immunhistochemischen Färbungen sehr interessant. Von den insgesamt 27 Fällen konnten von 17 die für die Färbungen notwendigen Paraffinblöcke der Primärtumoren gesammelt werden.

Einen Überblick über die Arbeitsschritte und die dazu gehörigen Fallzahlen gibt Abbildung 4.

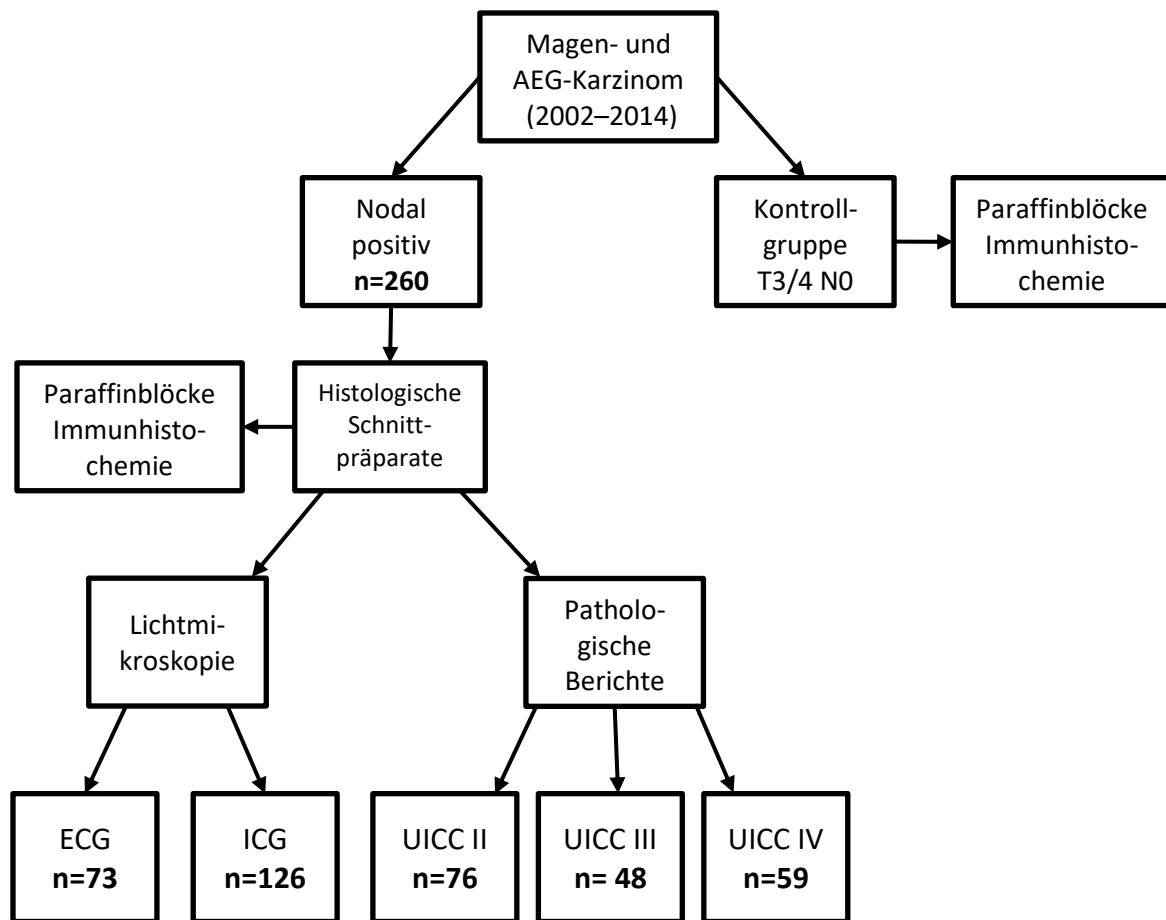


Abb. 4: Überblick über die Reihenfolge der wichtigsten Arbeitsschritte mit Fallzahlangaben.

3.2 Charakterisierung des Patientenkollektivs

3.2.1 Überblick

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über das vorliegende Patientenkollektiv. Die Kontrollgruppe in der rechten Spalte ist ausschließlich für den Teil der immunhistochemischen Färbungen von Bedeutung, der histomorphologische Teil der Arbeit bezieht sich stets nur auf die nodal positiven Fälle (Spalten zwei bis vier).

| Charakterisitk | Nodal Positiv | ECG | ICG | Kontrolle T3/4 N0 |
|------------------------------|---------------|-----------|------------|-------------------|
| Alle Patienten | 199 | 73 (36,7) | 126 (63,3) | 27 |
| Alter (in Jahren) | Median= 66 | | | |
| ≤66 | 100 (50,3) | 33 (33,0) | 67 (67,0) | 12 (44,4) |
| ≥67 | 99 (49,7) | 40 (40,4) | 59 (59,6) | 15 (55,6) |
| Geschlecht | | | | |
| Männlich | 128 (64,3) | 41 (32,0) | 87 (68,0) | 18 (66,7) |
| Weiblich | 71 (35,7) | 32 (45,1) | 39 (54,9) | 9 (33,3) |
| UICC | | | | |
| IA | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) |
| IB | 1 (0,5) | 0 (0,0) | 1 (100,0) | 0 (0,0) |
| IIA | 40 (20,1) | 5 (12,5) | 35 (87,5) | 21 (77,8) |
| IIB | 36 (18,1) | 11 (30,6) | 25 (69,4) | 4 (14,8) |
| IIIA | 31 (15,6) | 15 (48,4) | 16 (51,6) | 0 (0,0) |
| IIIB | 13 (6,5) | 9 (69,2) | 4 (30,8) | 2 (7,4) |
| IIIC | 4 (2,0) | 2 (50,0) | 2 (50,0) | 0 (0,0) |
| IV | 59 (29,6) | 27 (45,8) | 32 (54,2) | 0 (0,0) |
| Sonstiges | 16 (8,0) | 4 (25,0) | 12 (75,0) | 0 (0,0) |
| Tumorgroße | | | | |
| T0(vortherapiert) | 4 (2,0) | 1 (25,0) | 3 (75,0) | 0 (0) |
| T1 | 2 (1,0) | 0 (0,0) | 2 (100,0) | 0 (0) |
| T2 | 97 (48,7) | 27 (27,8) | 70 (72,2) | 0 (0) |
| T3 | 61 (30,7) | 25 (41,0) | 36 (59,0) | 21 (77,8) |
| T4 | 34 (17,1) | 19 (55,9) | 15 (44,1) | 6 (22,2) |
| Tx | 1 (0,5) | 1 (100,0) | 0 (0,0) | 0 |
| Nodaler Status | | | | |
| N0 | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 27 (100,0) |
| N1 | 89 (44,7) | 17 (19,1) | 72 (80,9) | 0 (0) |
| N2 | 59 (29,6) | 24 (40,7) | 35 (59,3) | 0 (0) |
| N3 | 51 (25,6) | 32 (62,7) | 19 (37,3) | 0 (0) |
| Metastasen | | | | |
| M0 | 127 (63,8) | 42 (33,1) | 85 (66,9) | 26 (96,3) |
| M1 | 59 (29,7) | 27 (45,8) | 32 (55,2) | 0 (0,0) |
| Mx | 13 (6,5) | 4 (30,8) | 9 (69,2) | 1 (3,7) |
| Lymphangiose | | | | |
| L0 | 56 (28,1) | 13 (23,2) | 43 (76,8) | 23 (85,2) |
| L1 | 143 (71,9) | 60 (42,0) | 83 (58,0) | 0 (0,0) |
| Lx | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 4 (14,8) |
| Tumor Grading(WHO) | | | | |
| G1 | 2 (1,0) | 1 (50,0) | 1 (50,0) | 0 (0) |
| G2 | 31 (15,6) | 7 (22,6) | 24 (77,4) | 4 (14,8) |
| G3 | 162 (81,4) | 63 (38,9) | 99 (61,1) | 22 (81,5) |
| Gx | 4 (2,0) | 2 (50,0) | 2 (50,0) | 1 (3,7) |
| Lauren-Klassifikation | | | | |
| intestinal | 108 (54,3) | 33 (30,6) | 75 (69,4) | 13 (48,1) |
| diffus | 69 (34,7) | 33 (47,8) | 36 (52,2) | 9 (33,3) |
| Mischtyp | 22 (11,1) | 7 (31,8) | 15 (68,2) | 3 (11,1) |
| X | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 1 (3,7) |
| Vortherapiert | | | | |
| nein | 140 (70,4) | 48 (34,3) | 92 (65,7) | 13 (48,1) |
| ja | 59 (29,6) | 25 (42,4) | 34 (57,6) | 14 (51,9) |
| unklar | 1 (0,5) | 0 (0,0) | 1 (100,0) | 0 (0,0) |

Tab. 4: Charakterisierung des Patientenkollektivs mit Absolutzahlen und Prozentangaben in Klammern. Die Prozente der Spalte ‚Nodal Positiv‘ beziehen sich stets auf n=199. Die Prozentangaben der Spalten ‚ECG‘ und ‚ICG‘ beziehen sich auf die zeilengleiche Absolutzahl der Spalte ‚Nodal Positiv‘. In der Kontrollgruppe beziehen sich die Prozentangaben stets auf n=27.

| Charakteristik | Nodal Positiv | ECG | ICG | Kontrolle T3/T4 N0 |
|--------------------------|---------------|-----------|------------|--------------------|
| Tumorlokalisation | | | | |
| Magen | 191 (96,0) | 69 (36,1) | 122 (63,9) | 26 (96,3) |
| Antrum | 31 (16,2) | 12 (38,7) | 19 (61,3) | 6 (22,2) |
| Korpus | 33 (17,3) | 11 (33,3) | 22 (66,6) | 10 (37,0) |
| Kardia | 68 (35,6) | 22 (32,4) | 46 (67,6) | 3 (11,1) |
| Fundus | 5 (2,6) | 4 (80,0) | 1 (20,0) | 0 (0,0) |
| Sonstiges | 54 (28,3) | 19 (35,2) | 35 (64,8) | 7 (25,9) |
| AEG | 8(4,0) | 5 (62,5) | 3 (37,5) | 1 (3,7) |

Tab. 5.: Überblick über die Tumorlokalisation des Patientenkollektivs mit Absolutzahlen und Prozentangaben in Klammern.

Die nachfolgende Tabelle bezieht sich ausschließlich auf die vorththerapierten Patienten.

| Charakteristik | Vorththerapiert, nodal positiv | ECG | ICG | Kontrollgruppe, vorththerapiert |
|---------------------------------|--------------------------------|-----------|-----------|---------------------------------|
| Gesamt | 59 | 25 (42,2) | 34 (57,6) | 14 |
| Regressionsgrad (Becker) | | | | |
| 1a | 5 (8,5) | 1 (20,0) | 4 (80,0) | 0 (0) |
| 1b | 8 (13,6) | 5 (62,5) | 3 (37,5) | 3 (21,4) |
| 2 | 19 (32,2) | 8 (42,1) | 11 (57,9) | 3 (21,4) |
| 3 | 26 (44,1) | 11 (42,3) | 15 (57,7) | 3 (21,4) |
| Sonstiges | 0 | 0 | 0 | 5 (35,7) |

Tab. 6: Überblick über das Ansprechen der vorththerapierten Patienten auf die Chemotherapie in Form des Regressionsgrades n. Becker mit Absolutzahlen und Prozentangaben in Klammern. Die Prozente beziehen sich in der Spalte ‚Vorththerapiert, nodal positiv‘ auf die Gesamtzahl n=59, in den Spalten ‚ECG‘ und ‚ICG‘ auf die zeilengleiche Zahl der Spalte ‚Vorththerapiert, nodal positiv‘ und in der Spalte ‚Kontrollgruppe, vorththerapiert‘ auf die Gesamtzahl n=14.

3.2.2 Klinische Charakteristika

Die nachfolgenden Zahlenangaben beziehen sich ausschließlich auf die nodal positiven Fälle. Die Kontrollgruppe mit den 27 T3/T4 N0 klassifizierten Fällen wird erst ab ‚3.3 Biomarker‘ mit in die Zahlenangaben eingeschlossen.

Die Studie umfasst 71 Frauen und 128 Männer (vgl. Abbildung 5); 177 davon mit Magenkarzinom und sieben mit einem Tumor des ösophagogastralen Übergangs (AEG) (vgl. Abbildung 6). Eine genauere Differenzierung der Tumorlokalisation ist in Abbildung 7 dargestellt.

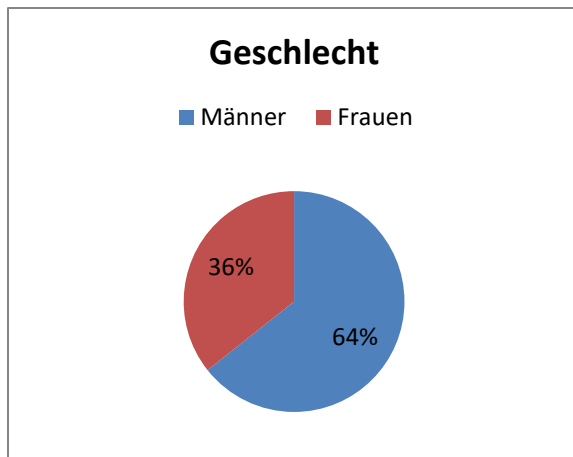


Abb. 5: Geschlechterverteilung der nodal positiven Fälle. Weiblich (n=71; 36%), Männlich (n=128; 64%). Gesamtkollektiv (n=199).

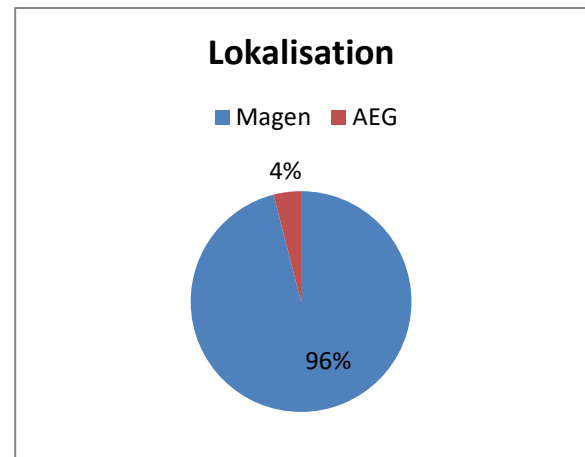


Abb. 6: Differenzierung der nodal positiven Fälle (n=199) in Magenkarzinom (n=191, 96%) und AEG-Tumor (n=8; 4%).

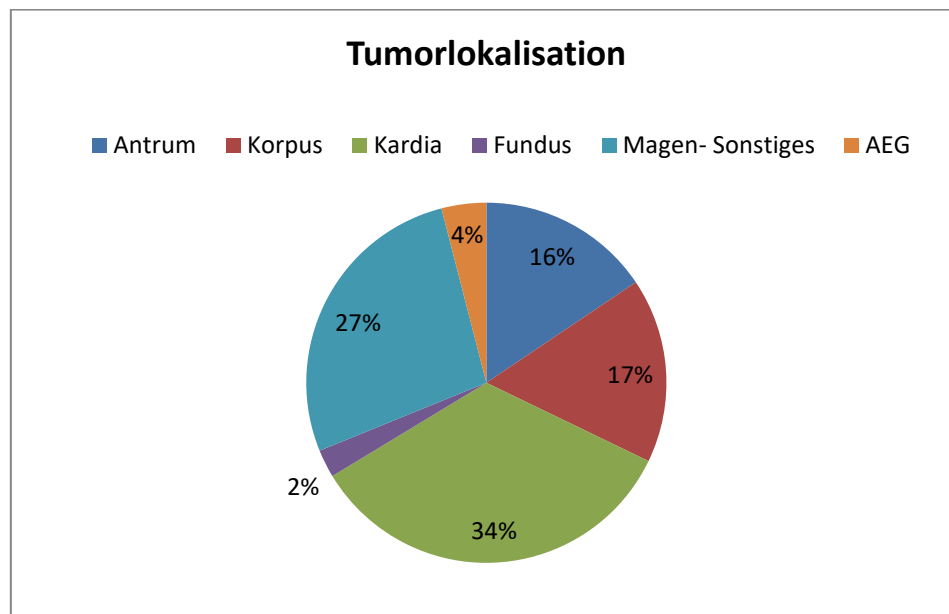


Abb. 7: Differenzierte Darstellung der Tumorlokalisation. Antrum (n=31), Korpus (n=33), Kardia (n=68), Fundus (n=5), Magen-Sonstiges (n=54), AEG (n=8). Gesamtkollektiv (n=199).

Anhand des Tumorregisters München wurden die Sterbedaten der bereits verstorbenen Patienten ermittelt sowie die letzten Kontaktdaten der noch lebenden Patienten, um daraus anschließend die Kaplan-Meier-Überlebensdaten zu ermitteln.

Zum Zeitpunkt des 27. Januar 2016 waren insgesamt 136 der 199 Patienten bereits verstorben, für die weiteren Patienten wurde der letzte Eintrag im Tumorregister oder das Datum des letzten Patientenkontaktes als Zensierungsdatum verwendet. Von drei Patienten konnten keine Daten im Tumorregister eruiert werden.

Die Sterbedaten wurden auch für die Kontrollgruppe gesammelt, da diese im immunhistochemischen Teil der Arbeit mit in die Überlebensstatistiken einfließen. 8 der 27 Patienten waren zum 27. Januar 2016 verstorben, von den restlichen 19 Patienten wurde wie bei den nodal positiven Fällen ein Zensierungsdatum notiert.

3.2.3 Histomorphologie

Die Einteilung der Tumore nach der Lauren-Klassifikation wurde größtenteils aus den pathologischen Berichten übernommen. Vereinzelt mussten die Fälle anhand der histologischen Schnitte der Primärtumore nachklassifiziert werden. Den größten Anteil stellt der intestinale Typ mit insgesamt 108 betroffenen Patienten dar, 69 Karzinome wurden als diffus klassifiziert und 22 als Mischtyp.

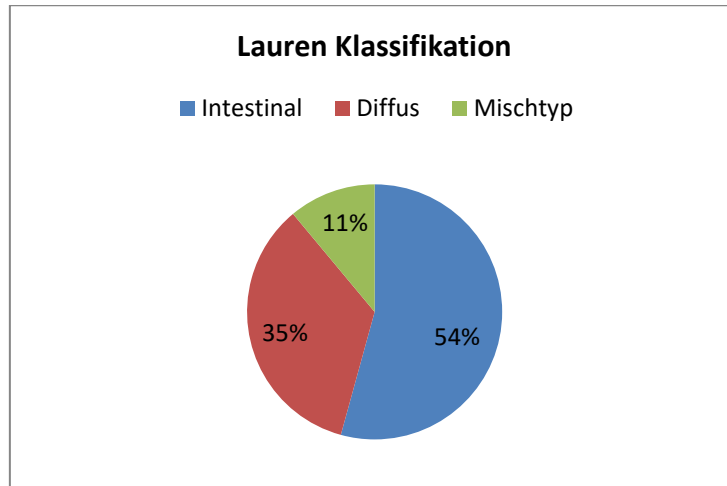


Abb. 8: Überblick über die Anteile der drei Untergruppen nach der Lauren-Klassifikation. Intestinaler Typ (n=108, 54%), diffuser Typ (n=69, 35%), Mischtyp (n=22, 11%). Gesamtkollektiv (n=199).

Anhand der Berichte des Pathologischen Instituts wurden außerdem folgende Daten erhoben: TNM-Klassifikation, UICC-Stadium, Vorhandensein von Lymphgefäßeinbrüchen (L), die Graduierung des Tumors (G), der Residualtumor (R) und bei vorhandener Vortherapie der Regressionsgrad nach Becker. Bei fehlender Information im pathologischen Bericht wurden die Fälle anhand der vorhandenen histologischen Präparate durch einen erfahrenen Pathologen nach klassifiziert. Dies war insbesondere für die Evaluation der Lymphangiome, des Gratings und des Regressionsgrades nach Becker für die älteren Fälle vor dem Jahr 2012 notwendig.

Ein Überblick über die prozentuale Verteilung der Stadien ergibt sich aus den nachfolgenden Diagrammen.

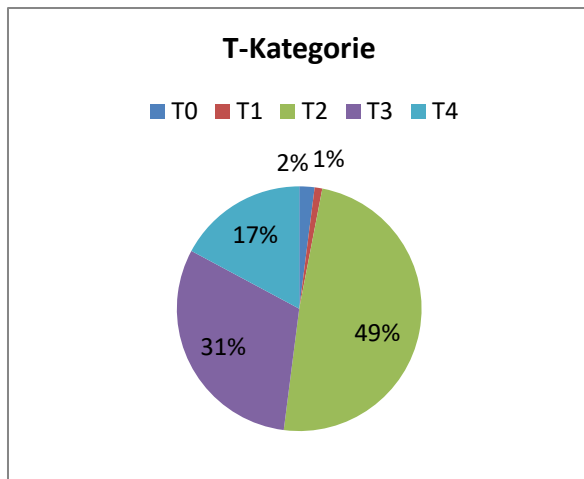


Abb. 9: Überblick über die Anteile der T-Kategorien. T0 (n=4; 2%), T1 (n=2; 1%), T2 (n=97; 49%), T3 (n=61; 31%), T4 (n=34; 17%). Gesamtkollektiv (n=198), von einem Patienten konnte retrospektiv kein T-Stadium eruiert werden (Tx=1, nicht dargestellt).

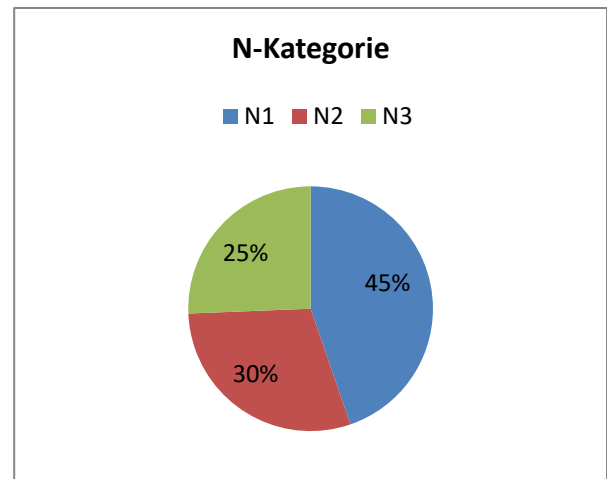


Abb. 10: Überblick über die Anteile der N-Kategorien. N1 (n=89; 45%), N2 (n=59; 30%), N3 (n=51; 25%). Gesamtkollektiv (n=199).

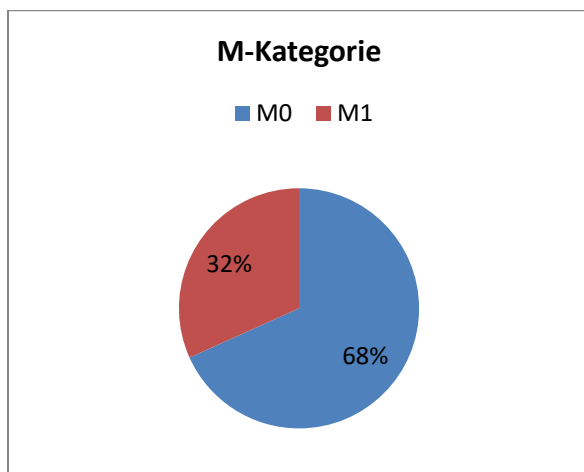


Abb. 11: Überblick über den Anteil der Patienten mit Fernmetastasen. M0 (n=127; 68%), M1 (n=59; 32%). Gesamtkollektiv (n=186), von 13 Patienten konnte retrospektiv kein M-Status evaluiert werden Mx (n=13, nicht dargestellt).

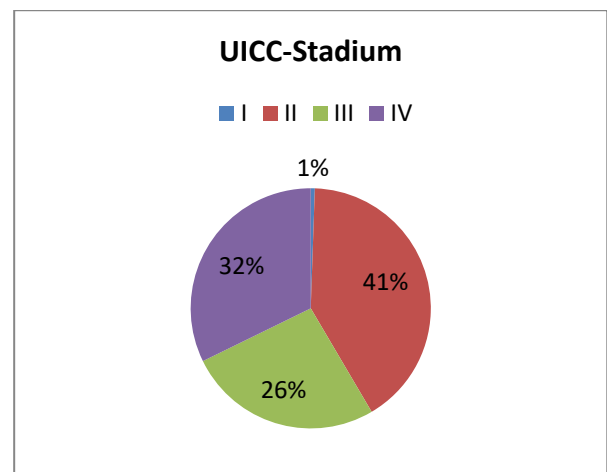


Abb. 12: Überblick über die Verteilung nach UICC-Stadien. I (n=1; 1%), II (n=75; 41%), III (n=48; 26%), IV (n= 59; 32%). Gesamtkollektiv (n=183). Von 16 Patienten konnten retrospektiv nicht alle relevanten Informationen eruiert werden oder waren nach neoadjuvanter Chemotherapie postoperativ als T0 klassifiziert UICC X (n=16, nicht dargestellt).

Der Anteil der vorththerapierten Patienten liegt bei knapp 30%, somit wurden 140 Patienten ohne Vorththerapie operiert, bei 59 Patienten wurde eine neoadjuvante Chemotherapie durchgeföhrt.

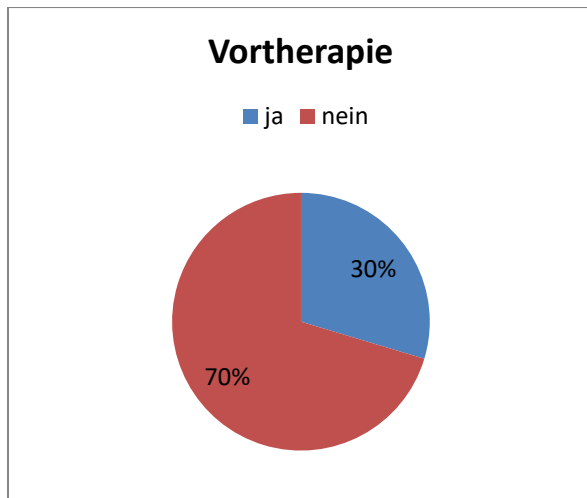


Abb. 13: Anteil der neoadjuvant vorththerapierten Patienten am Gesamtkollektiv (n=199). vorththerapiert (n=59; 29,6%), nicht vorththerapiert (n= 140; 70,4%).

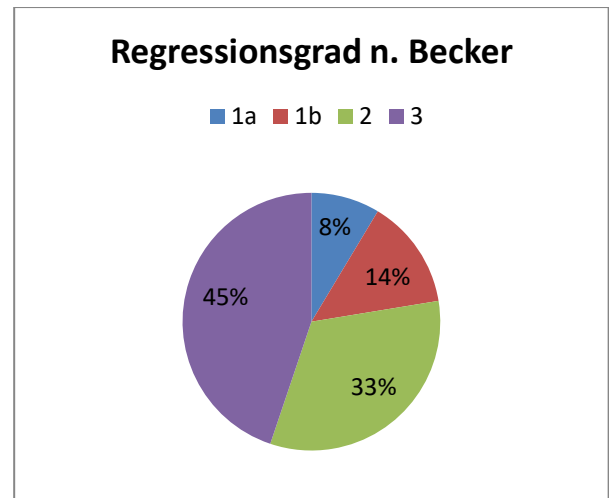


Abb. 14: Ansprechen der nodal positiven, vorththerapierten Patienten auf die Chemotherapie in Form des Regressionsgrades n. Becker. 1a (n=5), 1b (n=8), 2 (n=19), 3 (n=26). Gesamtkollektiv (n=59).

3.2.4 Extranodales Wachstum

Zunächst wurden die vorhandenen histologischen Schnitte der entnommenen Lymphknoten der Patienten lichtmikroskopisch begutachtet.

Die Präparate wurden auf das Vorliegen eines Kapseldurchbruchs untersucht, dabei wurde auch die Anzahl der extrakapsulär befallenen Lymphknoten festgehalten. Unterschieden wurden nach dem Grad der durch den Tumor zerstörten Kapsel drei Gruppen: kein Kapseldurchbruch, kleinherdiger Durchbruch mit nur einzelnen Tumorzellen und großflächige Kapselüberschreitung. Die Fälle mit kleinherdigem und großflächigem Kapseldurchbruch wurden aufgrund der geringen Anzahl der Untergruppen zusammengefasst als extranodal oder ‚ECG‘ bezeichnet. Für die Zuteilung in diese Gruppe war mindestens ein Lymphknoten mit kapselüberschreitendem Tumorwachstum notwendig.

Insgesamt konnten bei 73 Patienten Lymphknoten mit Kapseldurchbruch gefunden werden, davon 62 Fälle mit großflächiger Kapselüberschreitung, 11 mit nur einzelnen Tumorzellen außerhalb der Kapsel (vgl. Abbildung 16).

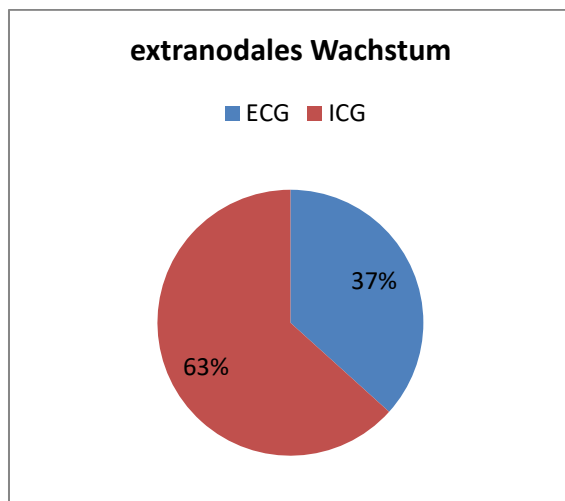


Abb. 15: Überblick über den Anteil mit extrakapsulären Lymphknotenmetastasen. ECG= extrakapsuläres Wachstum, ICG= rein intrakapsuläres Wachstum. ECG (n=73; 37%), ICG (n=126; 63%). Gesamtkollektiv (n=199).

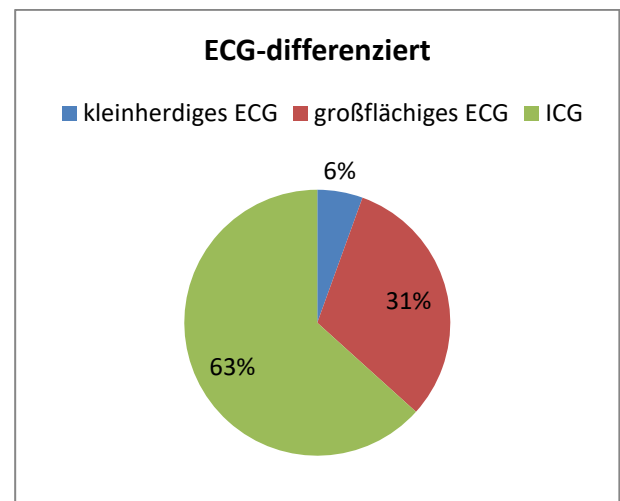


Abb. 16: Überblick über den Anteil mit extrakapsulären Lymphknotenmetastasen, differenziert in kleinherdigen und großflächigen Kapseldurchbruch. ECG= extrakapsuläres Wachstum, ICG= rein intrakapsuläres Wachstum. kleinherdiges ECG (n=11; 6%), großflächiges ECG (n=62; 31%), ICG (n=126; 63%). Gesamtkollektiv (n=199)

In Abbildung 17 sind H.E. Färbungen von Lymphknotenpräparaten in der Gegenüberstellung mit (c,d) und ohne (a,b) vorhandenen Kapseldurchbruch dargestellt.

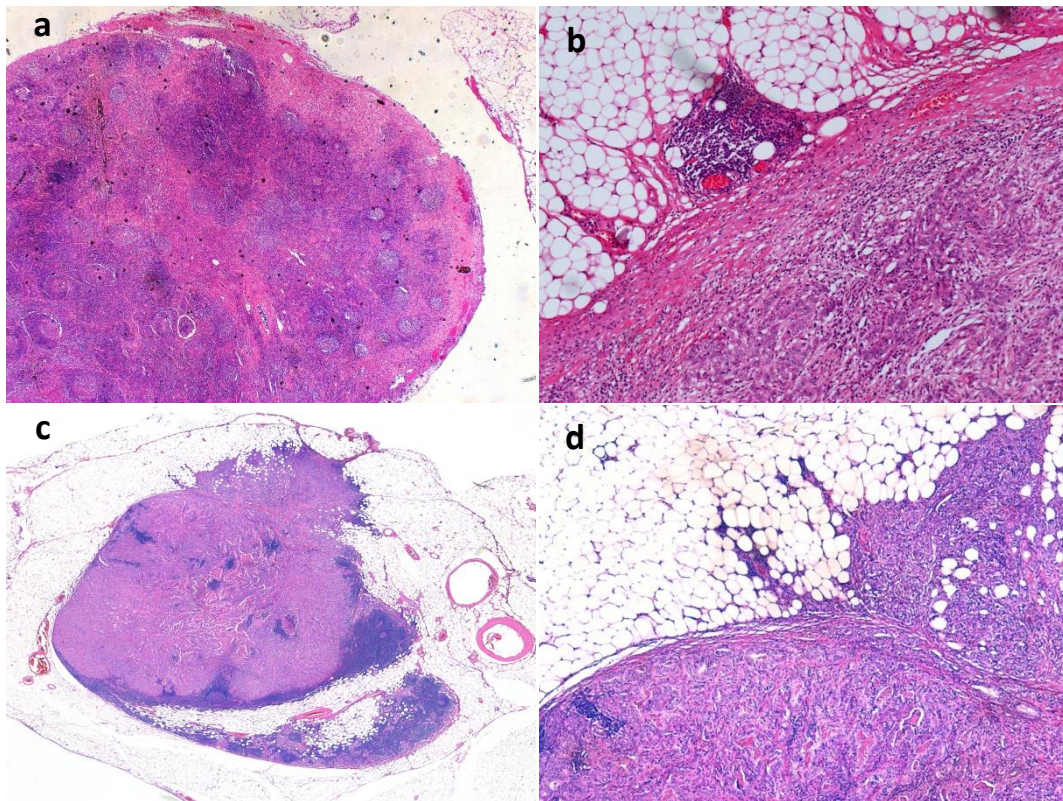


Abb. 17: LK-Präparate ohne (a,b) und mit (c,d) vorhandenem Kapseldurchbruch. a: LK ohne Kapseldurchbruch in 25-facher Vergrößerung; b: LK in 100-facher Vergrößerung ohne ECG; c, d: Derselbe LK in 25- und 100-facher Vergrößerung mit ausgeprägtem Kapseldurchbruch in das perinodale Fettgewebe.

3.3 Biomarker

3.3.1 Allgemeines

Die immunhistochemischen Färbungen wurden an insgesamt 210 Fällen durchgeführt (194 nodal positive Fälle und 17 als T3/T4 N0 klassifizierte Kontrollfälle).

Die Immunhistochemie wurde in Zusammenarbeit mit dem pathologischen Institut der Universitätsklinik der LMU München durchgeführt.

Für alle immunhistochemischen Färbungen wurden 2 µm dicke Schnitte der Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten (FFPE) Gewebeproben der Primärtumore verwendet. Als Objektträger wurden Super Frost Plus Objektträger gewählt.

Für MLH1, MSH2, CD133 und β-Catenin wurden automatisierte Färbungen verwendet. MLH1 und MSH2 wurden mit dem Gerät Benchmark Ultra gefärbt, für CD133 und β-Catenin wurde das Gerät Benchmark XT verwendet.

Die Marker SOX2 und SOX9 wurden per Hand gefärbt.

Chemikalien

| Substanz | Hersteller | Nummer |
|--|------------|--------------|
| Cell Conditioner 1 (CC1) | Ventana | 950-124 |
| Verdünnungsmedium DAKO (Antibody Diluent with Background Reducing Components) | Dako | S3022 |
| Ultra LCS | Ventana | 650-210 |
| Hematoxylin | Ventana | 760-2021 |
| Bluing Reagent | Ventana | 760-2037 |
| Epitope Retrieval Solution | Novocastra | RE7113 |
| NaCl | Merck | 1.06404.1000 |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochloride | Merck | 1.08219.1000 |
| Trizma® Base | Sigma | T1503 |
| H₂O₂ | Carl Roth | 9681.1 |
| Hematoxylin Gill's Formula | Vector | H-3401 |
| Kaisers Glyceringelatine | Merck | 1.09242.0100 |
| ProTaq IV Antigen-Enhancer | Quartett | 401602392 |

Tab. 7: Überblick über die in der Immunhistochemie verwendeten Chemikalien mit Herstellerangaben und Katalognummer

Primärantikörper

| Anikörper Anti- | Herkunft, Klonalität | Produkt-Nr | Hersteller |
|--------------------|-------------------------|-------------|------------------|
| MLH1 | Mouse, monoklonal | NCL-L-MLH1 | Leica |
| MSH2 | Mouse, monoklonal | 286M-18 | cell marque |
| CD133 | Mouse, monoklonal | 130-090-422 | Miltenyi Biotecs |
| β -Catenin | Mouse, monoklonal | 760-4242 | Ventana |
| SOX2 | Rabbit, monoklonal | 3579 | cell signaling |
| SOX9 | Rabbit, monoklonal | 82630 | cell signaling |

Tab. 8: Überblick über die verwendeten Antikörper mit Herkunft, Klonalität, bekannte Speziesreaktivität, Produkt-Nr. und Herstellerangaben

Detektionssysteme

| System | Konjugat | Produkt-Nr | Hersteller |
|--|-------------|------------|------------|
| OptiView DAB IHC | HRP | 760-700 | Ventana |
| UltraView DAB | HRP | 760-500 | Ventana |
| ImmPRESS Reagent Kit Anti-RABBIT Ig | HRP | MP-7401 | Vector |
| Chromogen DAB+ | HRP | K3467 | Dako |
| Vectastain ABC-Kit Elite Universal | Biotin, HRP | PK6200 | Vector |

Tab. 9: Überblick über die verwendeten Detektionssysteme mit Konjugat, Produkt-Nr. und Hersteller.

3.3.2 MLH1

MLH1 wurde mit dem Staining Module gefärbt, als Detektionssystem wurde U OptiView DAB IHC v5 verwendet. Anti MLH1 wurde in der Verdünnung 1:100 verwendet, als Verdünnungsmedium wurde DAKO benutzt.

Zunächst wurden die Objektträger auf 60°C erhitzt und für 4 min inkubiert. Zur Entparaffinierung wurde die Objektträger-Temperatur auf 62°C erhöht. Zur Hitzevorbehandlung wurden die Objektträger auf 100°C erwärmt und für 4 min inkubiert.

Als Pufferlösung wurde Cell Conditioner Nr.1 mit einem pH von 8,4 verwendet. Anschließend wurde der Primär Antikörper Anti MLH1 mit der Verdünnung 1:100 per Hand titriert und für 40 min inkubiert. Es folgte das Auftragen des Detektionssystems OptiView DAB IHC.

Zur Gegenfärbung wurde schließlich ein Tropfen Hematoxylin und anschließend LCS aufgetragen und für 4 min inkubiert. Die Nach-Gegenfärbung erfolgte durch Auftragen eines Tropfens Bluing Reagent und LCS.

3.3.3 MSH2

MSH2 wurde ebenfalls mit dem Staining Module gefärbt, als Detektionssystem diente U ultraView DAB. Anti-MSH2 wurde von der Firma Cell Marque in der Konzentration ‚ready to use‘ geliefert.

Die Objektträger wurden auf 75°C erhitzt und für 4 min inkubiert. Zur Entparaffinierung wurde die Objektträger-Temperatur auf einer Temperatur von 72°C gehalten; die Hitzevorbehandlung erfolgte mit einer Temperatur von auf 95°C mit einer Inkubationszeit von 8 min.

Als Pufferlösung wurde Cell Conditioner Nr.1 mit einem pH von 8,4 verwendet. Nachdem die Antikörper Inkubations-Temperatur definiert wurde, wurden die Objektträger auf 37°C erwärmt und für 4 min inkubiert.

Anschließend wurde je 1 Tropfen Anti-MSH2 und LCS aufgetragen und für 4 min inkubiert. Als Detektionssystems wurde ultraView DAB verwendet.

Als Gegenfärbung wurde schließlich ein Tropfen Hematoxylin und anschließend LCS aufgetragen und für 4 min inkubiert. Abschließend wurde zur Nach-Gegenfärbung ein Tropfen Bluing Reagent und LCS aufgetragen und erneut für 4 min inkubiert.

3.3.4 Beta Catenin

Für β -Catenin wurde das IHC/ISH Färbemodul verwendet. Als Detektionssystem diente ultraView DAB. Der Primärantikörper wurde von der Firma Ventana in der Konzentration ‚ready to use‘ verwendet.

Die Objektträger wurden zunächst entparaffiniert und hitzevorbehandelt.

Als Pufferlösung diente Cell Conditioner Nr.1 mit einem pH-Wert von 8,4. Hier wurde zusätzlich die Auswahl ‚Mildes CC1‘ am Gerät getroffen.

Anschließend wurde 1 Tropfen Anti- β -Catenin aufgetragen und für 28 min inkubiert. Als Detektionssystem wurde an dieser Stelle ultraView DAB verwendet.

Anschließend folgte die Gegenfärbung mit einem Tropfen Hematoxylin. Dies wurde nach Auftragen von LCS für 4 min inkubiert. Die Nach-Gegenfärbung wurde ebenfalls mit Bluing Reagent und LCS durchgeführt und für 4 min inkubiert.

3.3.5 CD133

Für CD133 wurde ebenfalls das ICH/ISH Färbemodul verwendet. Als Detektionssystem diente ultraView DAB. Als Primärantikörper wurde AC133 von der Firma Miltenyi Biotec in der Verdünnung 1:25 verwendet.

Zunächst erfolgte die Entparaffinierung und Hitzevorbehandlung der Objektträger.

Als Pufferlösung wurde Cell Conditioner Nr.1 mit einem pH-Wert von 8,4 verwendet. Hier wurde zusätzlich die Auswahl ‚Mildes CC1‘ am Gerät getroffen. Die Paraffinschnitte wurden für insgesamt 30 min in der Pufferlösung gespült.

Anschließend wurde manuell 1 Tropfen des Primärantikörpers aufgetragen und für 36 Minuten inkubiert. Als Detektionssystem wurde hier ultraView DAB verwendet.

Zur Gegenfärbung wurden Hematoxylin und LCS verwendet und für 4 min inkubiert. Zur Nach-Gegenfärbung diente ebenfalls Bluing Reagent und LCS, welche nach dem Auftragen erneut für 4 min inkubiert wurden.

3.3.6 SOX2

SOX2 Färbung

Die 2 µm FFPE Schnitte wurden zunächst entparaffiniert. Hierfür wurden sie 30 min in Xylol gespült. Anschließend wurde eine Rehydratation mit absteigender Alkoholreihe bis zum Aqua dest. durchgeführt.

Während der Demaskierung der Antigene wurde als Pufferlösung Epitope Retrieval Solution mit pH6 verwendet. Die Präparate wurden für zweimal 15 min in der Mikrowelle bei 750 W gekocht und anschließend 20 min bei Raumtemperatur abgekühlt.

Danach wurde für zweimal 5 min mit TRIS-Puffer gespült. Es folgte die Blockierung der endogenen Peroxidase durch Spülen mit 7,5%igem wässrigen Wasserstoffperoxid für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Objektträger für 10 min fließend gewässert. Für die 7,5%ige Wasserstoffperoxid-Lösung wurde 30%iges H₂O₂ im Verhältnis 1:4 mit A.dest verdünnt.

Als Detektionssystem wurde das ImmPRESS Reagent Kit Anti-RABBIT Ig verwendet.

Nach erneutem Spülen mit TRIS-Puffer wurde das Blocking Serum des ImmPRESS Reagent Kits aufgegeben und für 20 min inkubiert. Der Überstand wurde anschließend abgekippt.

Es wurden je 100 µl des Primärantikörpers Anti-SOX2 in der Verdünnung 1:50 auf die Schnitte gegeben und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Verdünnungsmedium diente DAKO.

Nach erneutem Spülen mit Pufferlösung (zweimal 5 min) wurde der Sekundärantikörper Anti-Rabbit Ig aus dem ImmPRESS Reagent Kit aufgetropft und für 30 min inkubiert.

Nach erneutem Spülen mit TRIS-Puffer wurden die Präparate mit dem Chromogen DAB+ für 3 min angefärbt und anschließend für 10 min fließend gewässert.

Als Gegenfärbung diente Hematoxylin Gill's Formula (Einwirkungsdauer 10 sec).

Nach 10 min fließendem Wässern wurden die Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

3.3.7 SOX9

Herstellung des ABC-Kits:

Das ABC-Kit wurde gemäß Herstellerangaben gemischt. Für das Blocking Serum wurden 10 ml TRIS-Puffer mit 2 Tropfen des Pferdeserums gemischt, für den Sekundär-Antikörper (Anti-Rabbit IgG) wurden je 4 Tropfen Serum und 4 Tropfen des Sekundär-Antikörpers mit 10 ml TRIS-Puffer gemischt. Das ABC-Reagenz wurde aus 10 ml TRIS-Puffer und je 4 Tropfen aus Komplex A und B hergestellt.

SOX9 Färbung

Die 2 µm FFPE Schnitte wurden zunächst entparaffiniert. Hierfür wurden sie 30 min in Xylol gespült. Es folgte eine Rehydratation mit absteigender Alkoholreihe bis zum Aqua dest.. Während der Demaskierung der Antigene wurde als Pufferlösung ProTaq's IV Antigen-Enhancer mit pH 9 verwendet. Die Präparate wurden für zweimal 15 min in der Mikrowelle bei 750 W gekocht und anschließend 20 min bei Raumtemperatur abgekühlt.

Nach zweimal 5 min Spülen mit TRIS-Puffer folgte die Blockierung der endogenen Peroxidase durch Spülen mit 7,5%igem wässrigen Wasserstoffperoxid für 10 min bei Raumtemperatur mit anschließend fließendem Wässern für 10 min. Für die 7,5%ige Wasserstoffperoxid-Lösung wurde 30%iges H₂O₂ im Verhältnis 1:4 mit A.dest verdünnt.

Als Detektionssystem wurde für SOX9 ebenfalls das ABC-Kit verwendet.

Nach erneutem Spülen mit TRIS-Puffer wurde für 20 min das Blocking Serum aus dem ABC-Kit (zur Herstellung des Kits siehe oben) aufgetropft und der Überstand abgekippt.

Anschließend wurden je 100 µl des Primärantikörpers Anti-SOX9 in der Verdünnung 1:100 auf die Schnitte gegeben und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Verdünnungsmedium diente DAKO.

Nach erneutem Spülen mit TRIS-Puffer wurde der gemäß des ABC-Kits gemischte biotinylierte Sekundärantikörper Anti-Rabbit IgG aufgegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte erneutes Spülen mit TRIS Puffer (zweimal 5 min); anschließend wurden die Präparate als letzter Schritt des ABC-Kits für 30 min mit dem HRP-konjugierten ABC-Komplex inkubiert.

Nach erneutem Spülen mit Pufferlösung wurden die Schnitte schließlich durch das Chromogen DAB+ für 3 min angefärbt und anschließend für 10 min fließend gewässert.

Die Gegenfärbung erfolgte mit Hematoxylin Gill's Formula für 10 sec. Nach abschließendem 10 min Wässern wurden die Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine luftleer eingedeckt.

3.4 Statistik

Der Vergleich des Überlebens wurde stets mit Hilfe der Kaplan-Meier-Statistik berechnet. Als uni- und multivariates Analyseverfahren diente die Cox-Regression.

Der Zusammenhang des ECG mit den histomorphologischen Parametern bzw. der Expression der Biomarker wurde bei ausreichend hoher Fallzahl mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests untersucht.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des SPSS-Programms Version 23.0.

4 Ergebnisse

4.1 Histomorphologie

4.1.1 Einfluss der histomorphologischen Parameter auf das Überleben

Es folgen zunächst die Überlebenskurven und die dazu gehörigen Hazard-Ratios des gesamten nodal positiven Kollektivs in Abhängigkeit vom N-Stadium, T-Stadium und UICC-Stadium. Somit wird gezeigt, dass die allgemein bekannten, prognostisch relevanten Faktoren auf die Fälle dieser Studie übertragbar sind.

Anschließend werden die Gruppen ECG und ICG auf das Überleben verglichen. Zunächst wird dabei das Gesamtkollektiv betrachtet. Um die Gruppen ECG und ICG homogener zu gestalten, werden anschließend noch die UICC III klassifizierten Fälle betrachtet. Mit Hilfe der Cox-Regression wird anschließend der potentielle Prognosefaktor ‚ECG‘ auf Unabhängigkeit untersucht.

a. N-Stadium

Insgesamt wurden 136 Ereignisse und 60 Zensierungen (30,6%) beobachtet (N1: 57 Ereignisse, 31 Zensierungen (35,2%), N2: 38 Ereignisse, 20 Zensierungen (34,5%), N3: 41 Ereignisse, 9 Zensierungen (18,0%)).

Der Log-Rank-Test ergab einen p-Wert $<0,0001$; das Gesamtüberleben unterscheidet sich somit signifikant.

Die Mittelwerte unterschieden sich wie folgt: N1 39,8 Monate (95% KI 31,2-48,4; Standardabweichung 4,4); N2 30,8 (95% KI 22,1-39,5; Standardabweichung 4,4); N3 12,7 (95% KI 9,2- 16,1, Standardabweichung: 1,8).

Das mediane Überleben lag bei 32,0 Monaten für N1 (95% KI 24,8-39,2, Standardabweichung 3,7), bei 20,0 Monaten für N2 (95% KI 16,5- 23,5, Standardabweichung 1,8) und bei 9,0 Monaten für N3 (95% KI 6,5-11,5, Standardabweichung 1,3).

Die Cox-Regression ergab eine HR von 2,8 (95% KI 1,8-4,3; $p<0,0001$) für Stadium N3 gegenüber N1 und N2.

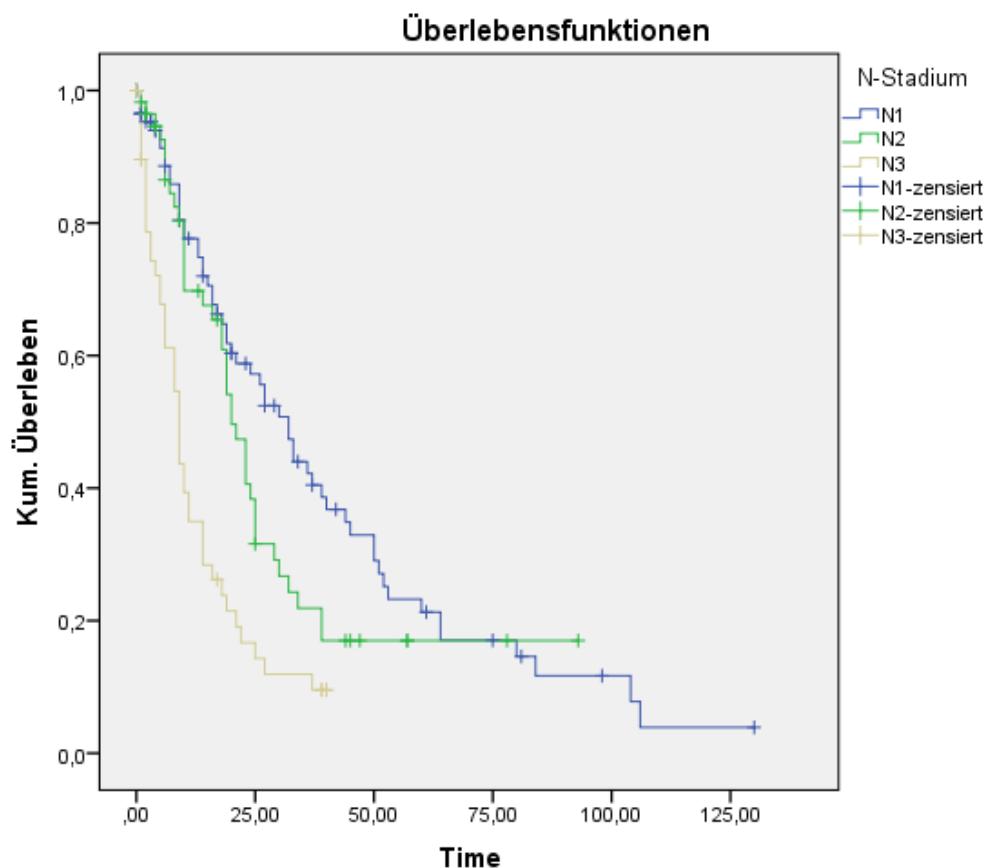


Abb. 18: Magenkarzinom: kumulatives Überleben nach N-Stadien. N1 (n=88; 44,9%), N2 (n=58; 29,6%), N3 (n= 50; 25,5%). Gesamtkollektiv n=196.

b. T-Stadium

Zur Auswertung des kumulativen Überlebens in Abhängigkeit vom T-Stadium wurden aufgrund der kleinen Fallzahlen der Gruppen T0 (n=3) und T1 (n=2) die Gruppen T0 bis T2 zusammengefasst.

Ein Vergleich des Überlebens in Abhängigkeit vom T-Stadium mit den allgemein bekannten Daten ist für dieses Patientenkollektiv problematisch, da es sich bei den hier vorliegenden Karzinomen ausschließlich um nodal positive Fälle handelt. Die nachfolgenden Daten dürfen deshalb nur als Tendenz des Einflusses des T-Stadiums angesehen werden und sollen keineswegs den allgemein bekannten Daten entsprechen.

Die Gesamtanzahl der Ereignisse lag wiederum bei 136, die Anzahl der Zensurierungen bei 59. In den Gruppen T0-2 wurden insgesamt 68 Ereignisse und 34 Zensurierungen (33,3%) beobachtet; bei T3 44 Ereignisse und 16 Zensurierungen (26,7%) und bei T4 24 Ereignisse und 9 Zensurierungen (27,3%).

Der Log-Rank-Test ergab einen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben ($p = 0,03$).

Die Mittelwerte der Gruppen sind im Nachfolgenden dargestellt:

T0-2: 37,7 Monate (95% KI 29,4-45,9; Standardabweichung 4,2), T3: 25,8 Monate (95% KI 16,5-34,0, Standardabweichung 4,5), T4: 18,2 Monate (95% KI 10,2- 26,1; Standardabweichung 4,1).

Das mediane Überleben lag für T0-T2 bei 23,0 Monaten (95% KI 18,0- 28,0; Standardabweichung 2,6), für T3 bei 18,0 Monaten (95% KI 9,7-26,3; Standardabweichung 4,3) und für T4 noch bei 10 Monaten (95% KI 5,1-15,0; Standardabweichung 2,5).

Die Cox-Regression für Stadium T4 ergab eine nicht signifikante HR von 2,5 (95% KI 0,6-10,7; $p=0,2$).

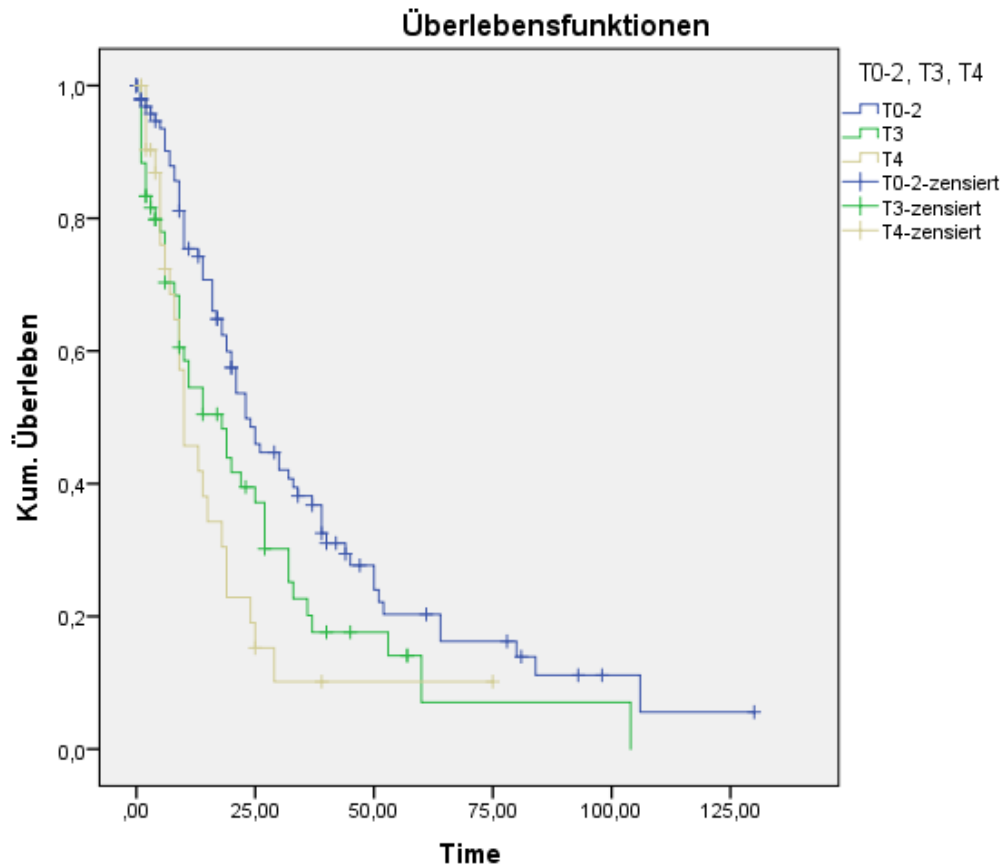


Abb. 19: Magenkarzinom: Kumulatives Überleben nodal positiver Fälle nach T-Stadien. T0, T1 und T2 wurden zusammengefasst. T0-2 (n=103; 52,8%), T3 (n=60;30,8%), T4 (n=33; 16,9%). Gesamtkollektiv: n=195.

c. UICC Stadium

Für die nachfolgenden Daten wurden die Gruppen UICC I und II aufgrund der geringen Anzahl von UICC I Fällen (n=1) zusammengefasst. Auch hier ist anzumerken, dass es sich bei den Berechnungen ausschließlich um nodal positive Fälle handelt, auch wenn dies durch die UICC Klassifikation größtenteils vereinheitlicht wird.

Insgesamt wurden 126 Ereignisse und 56 Zensierungen beobachtet (UICC Stadien I und II (n=77): 50 Ereignisse, 27 Zensierungen; UICC Stadium III (n=47): 31 Ereignisse, 16 Zensierungen; UICC Stadium IV (n=58): 45 Ereignisse, 13 Zensierungen).

Für das hier vorliegende Patientenkollektiv konnte der bekannte Überlebensunterschied beim Magenkarzinom in Abhängigkeit vom UICC Stadium nachvollzogen werden ($p < 0,0001$).

Die Mittelwerte lagen für die Gruppen UICC I-II bei 43,3 Monaten (95% KI 33,6-53,1; Standardabweichung 5,0), für UICC III bei 23,8 Monaten (95% KI 15,8- 31,8; Standardabweichung 4,1) und für UICC IV bei 19,7 Monaten (95% KI 13,3- 26,2; Standardabweichung 3,3).

Das mediane Überleben der Gruppen UICC I-II war 32,0 Monate (95% KI 25,0- 39,0; Standardabweichung: 3,3), bei UICC III 14,0 Monate (95% KI 6,8-21,2; Standardabweichung 3,7) und bei UICC IV 11,0 Monate (95% KI 6,1- 15,9; Standardabweichung 2,5).

Die Hazard Ratios (HRs) lagen bei 2,36 (95% KI 1,56-3,57; $p < 0,0001$) für UICC IV und bei 1,90 (95% KI 1,20-3,01; $p = 0,006$) für UICC III.

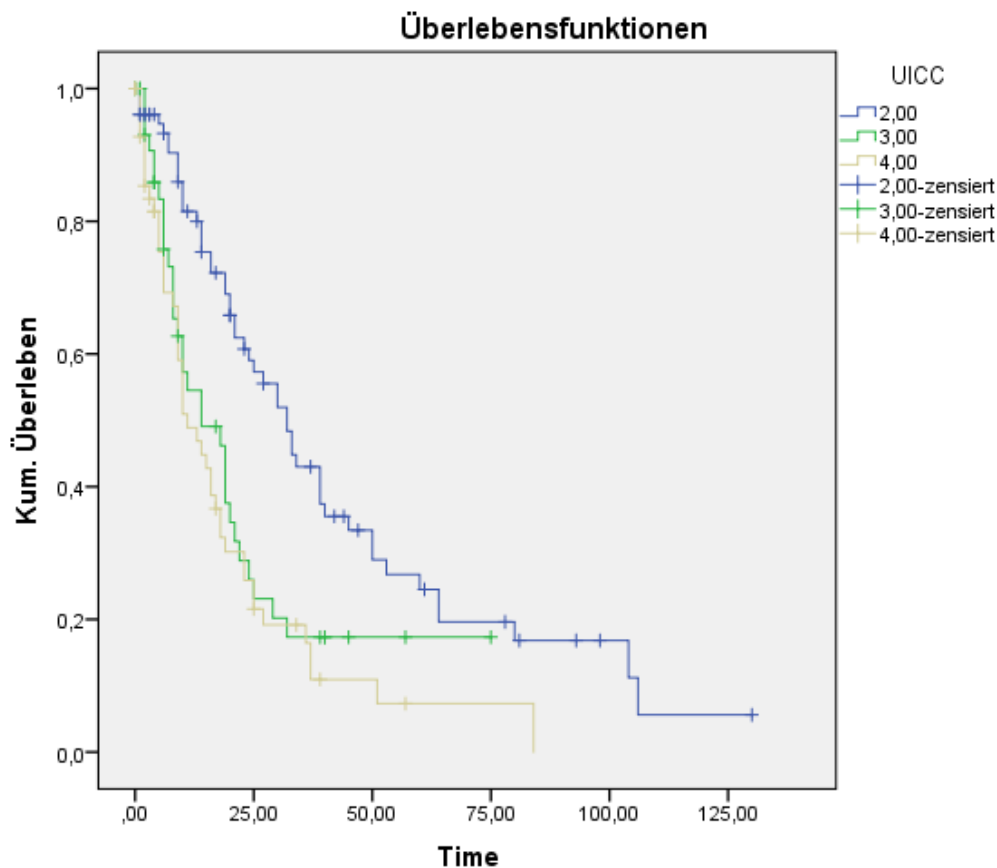


Abb. 20: Magenkarzinom. Kumulatives Überleben nodal positiver Fälle nach UICC-Stadien. UICC I und II wurden zusammengefasst. UICC I-II (n=77; 42,3%), UICC III (n=47; 25,8%), UICC IV (n=58; 31,9%). Gesamtkollektiv: n=182.

d. ECG vs ICG gesamt

In dieser Studie konnte ein statistisch signifikanter Unterschied der kumulativen Überlebensfunktionen in Abhängigkeit des extrakapsulären Wachstums nachgewiesen werden ($p < 0,0001$; vgl. Abbildung 21).

Bei den 72 Patienten mit extrakapsulär befallenen Lymphknoten wurden 54 Ereignisse und 18 Zensurierungen beobachtet, die mittlere Überlebensdauer lag bei 16,21 Monaten (95% KI 11,69-20,74; Standardabweichung 2,31).

Die Gruppe mit rein intrakapsulärem Lymphknotenbefall umfasst 124 Patienten, davon 82 beobachtete Ereignisse und 42 Zensurierungen. Die mittlere Überlebensdauer lag hier bei 37,07 Monaten (95% KI 30,28-43,85; Standardabweichung 3,46).

Die Cox-Regression ergab univariat eine HR von 2,4 (95% KI 1,7-3,4; $p < 0,0001$). Auch in der multivariaten Analyse blieb der Parameter des extrakapsulären Wachstums ein unabhängiger Prognosefaktor (HR= 2,1; 95% KI 1,4-3,1; $p = 0,001$).

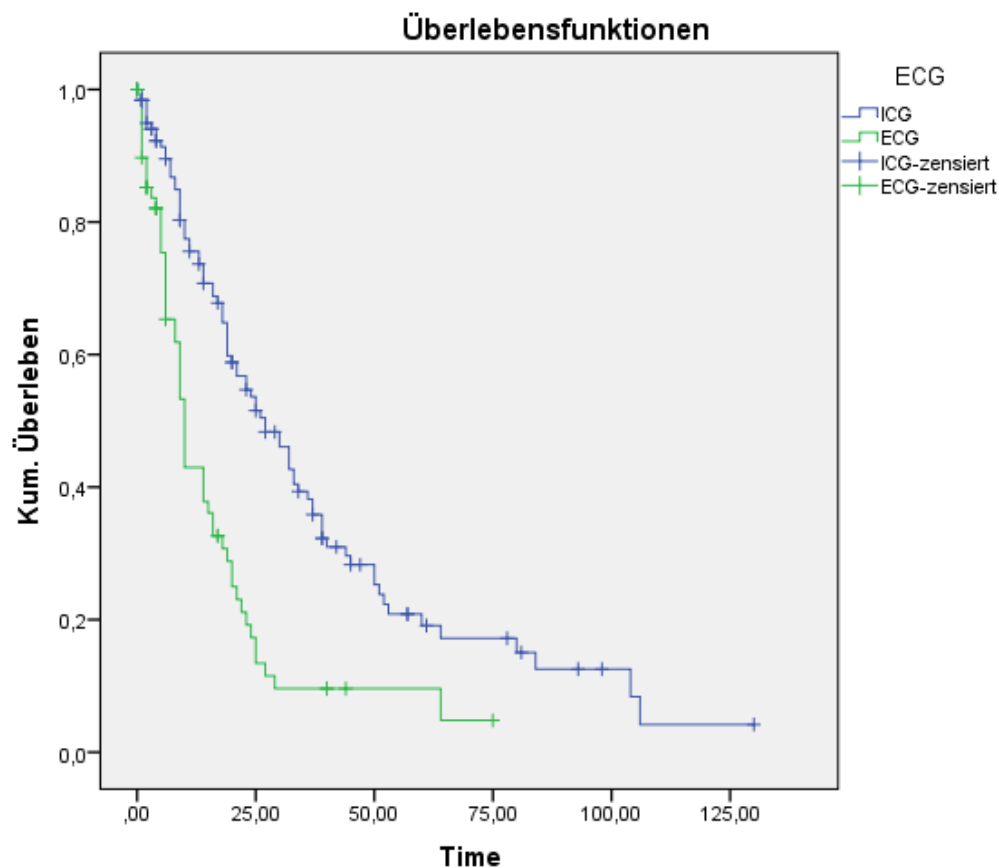


Abb. 21: Magenkarzinom. Kumulatives Überleben nodal positiver Fälle nach Vorhandensein eines Kapseldurchbruchs befallener Lymphknoten. ECG= extrakapsulärer Lymphknotenbefall, ICG= ausschließlich intrakapsulärer LK-Befall. ECG (n=72; 36,7%), ICG (n=124; 63,3%).

e. UICC3- ECG vs. ICG

Um die beiden zu vergleichenden Gruppen möglichst homogen zu gestalten, wurden im Folgenden zunächst alle nach der UICC Klassifikation in UICC III eingestuft Fälle verglichen. Die nachfolgende Statistik umfasst UICC IIIA bis UICC IIIC Tumoren. Von den insgesamt 46 als UICC III klassifizierten Fällen wurde bei 24 ein extranodales Wachstum festgestellt. In dieser Gruppe wurden 15 Ereignisse und 9 Zensurierungen beobachtet. Die Gruppe mit rein intrakapsulärem Lymphknotenbefall umfasst somit 22 Patienten; es wurden ebenfalls 15 Ereignisse und folglich 7 Zensurierungen beobachtet.

Der Vergleich der kumulativen Überlebensfunktionen ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p=0,61$). Die mittlere Überlebensdauer lag bei 21,92 Monaten (95% KI 13,83-30,01; Standardabweichung:4,13) für die ICG-Gruppe und bei 23,77 Monaten (95% KI 11,84-35,69; Standardabweichung: 6,09) für die ECG-Gruppe (vgl. Abbildung 22).

Die Cox-Regression ergab eine HR von 1,2 (95% KI 0,6-2,4; $p=0,62$).

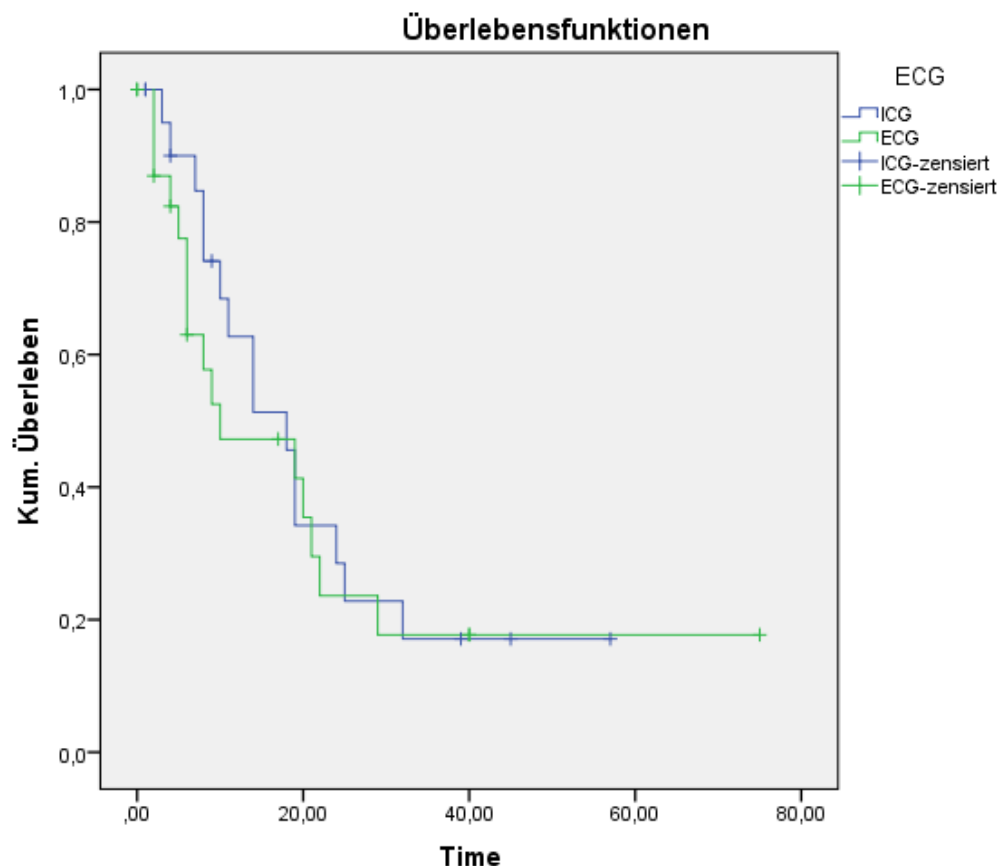


Abb. 22: Magenkarzinom. Kumulatives Überleben nodal positiver, als UICC III-klassifizierte Fälle, ECG= extrakapsulärer Lymphknotenbefall, ICG= ausschließlich intrakapsulärer LK-Befall. ECG (n=25;53%), ICG (n=22;47%). Gesamtkollektiv UICC 3 (n=47).

f. UICC2 ECG vs. ICG

Nachfolgend ist das Gesamtüberleben der als Stadium UICC II eingeteilten Fälle in Abhängigkeit vom Vorhandensein von extrakapsulärem Wachstum dargestellt.

Insgesamt wurden 76 Fälle als UICC II klassifiziert, bei 16 davon konnte ein Kapseldurchbruch nachgewiesen werden (14 Ereignisse, 2 Zensierungen). 60 Fälle hatten rein intrakapsuläres Wachstum (35 Ereignisse, 25 Zensierungen).

Die mittlere Überlebensdauer lag bei den ECG-Fällen bei 21,0 Monaten (95% KI 11,3-30,6; Standardabweichung: 5,0), bei den ICG-Fällen bei 50,7 Monaten (95% KI 39,0-62,4; Standardabweichung: 6,0). Das Gesamtüberleben war somit in der Gruppe ohne Kapseldurchbruch (ICG) signifikant länger als in der mit vorhandenem Kapseldurchbruch (ECG) ($p=0,001$).

Die Cox-Regression ergab eine HR von 2,9 (95% KI 1,5-5,6; $p=0,001$). Es konnte ein signifikanter Überlebensunterschied der Gruppen ECG vs. ICG nachgewiesen werden.

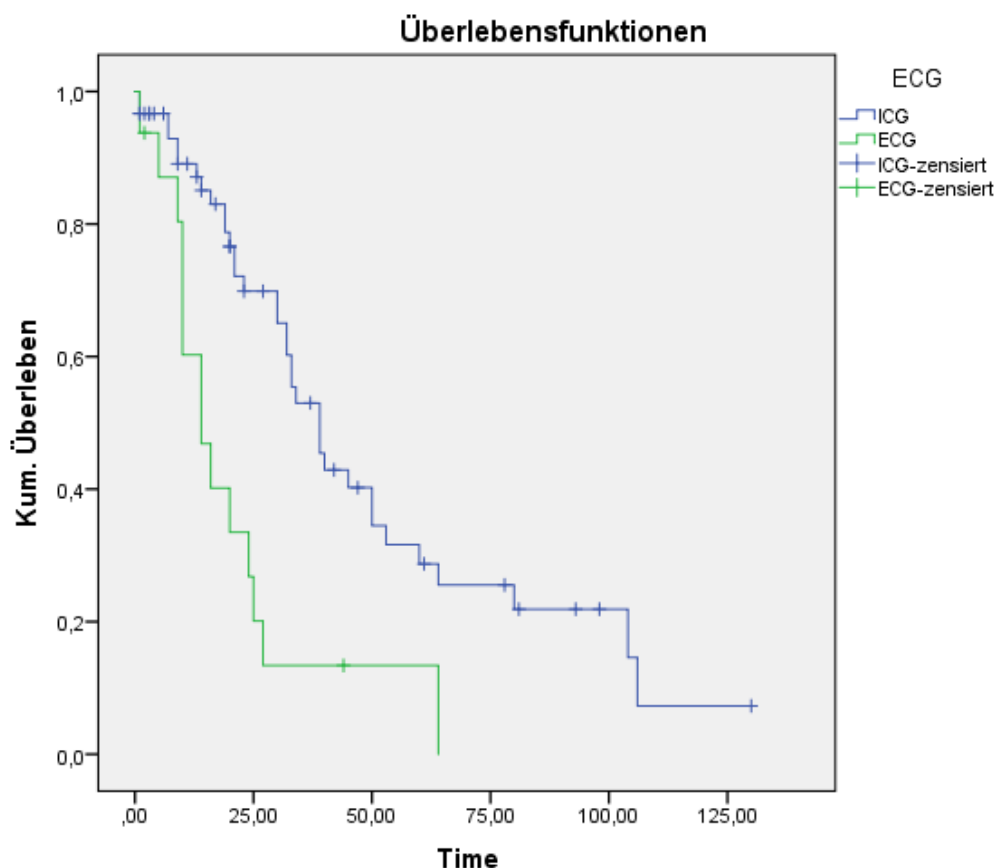


Abb. 23: Magenkarzinom. Kumulatives Überleben nodal positiver, als UICC II-klassifizierte Fälle, ECG= extrakapsulärer Lymphknotenbefall, ICG= ausschließlich intrakapsulärer LK-Befall. ECG (n=16;21%), ICG (n=60;79%). Gesamtkollektiv UICC II (n=76).

4.1.2 Zusammenhang der histomorphologischen Parameter mit dem ECG

a. TNM-Stadium und ECG

Es konnte nachgewiesen werden, dass der prozentuale Anteil von Patienten mit extrakapsulär befallenen Lymphknoten mit dem T-Stadium korreliert. Die beiden als T1 klassifizierten Patienten wurden beide als ICG eingestuft. In T2 sind nur knapp 28% (n=97) der Patienten von einem Kapseldurchbruch betroffen, während es in T3 41% (n=61) und in T4 bereits 56% (n=34) sind (vgl. Abbildung 24). Der Chi Quadrat Test ergab einen statistisch signifikanten Unterschied in den Gruppen (p=0,03).

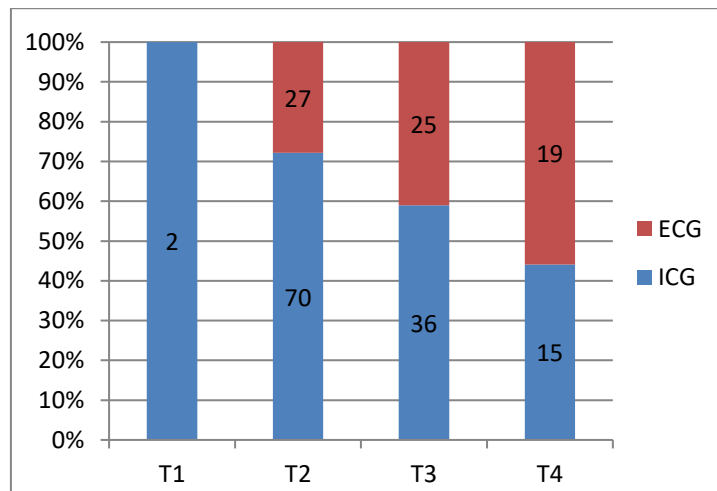


Abb. 24: Überblick über die prozentuale Verteilung des extrakapsulären Wachstums in Abh. vom T-Stadium. ECG= extrakapsuläres Wachstum, ICG= intrakapsuläres Wachstum. T1 (n=2; 1%), T2 (n=97; 50,0%), T3 (n=61; 31,5%), T4 (n=34; 17,5%). Gesamtkollektiv (n=194).

Die Korrelation von extrakapsulärem Lymphknotenbefall mit dem N-Stadium ist statistisch hochsignifikant (p<0,0001). Im Stadium N1 liegt der Anteil des ECG bei 19% (n=89), im Stadium N2 bei 41% (n=59) und bei N3 bei 63% (n= 51) (vgl. Abbildung 25).

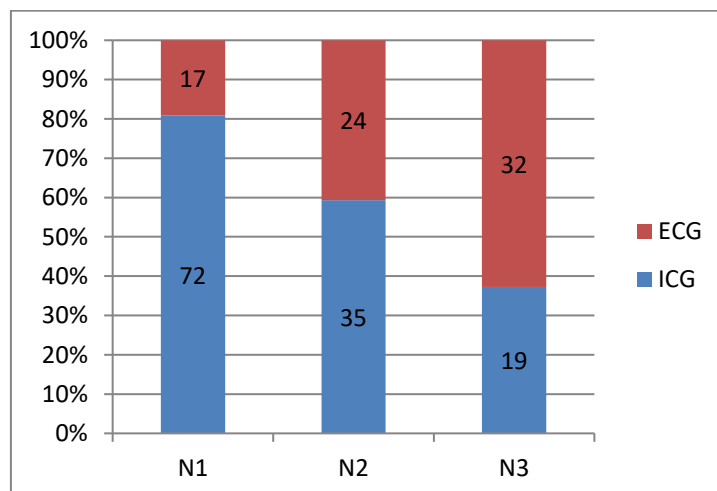


Abb. 25: Überblick über die prozentuale Verteilung des extrakapsulären Wachstums in Abh. vom N-Stadium. ECG= extrakapsuläres Wachstum, ICG= intrakapsuläres Wachstum. N1 (n=89; 44,8%), N2 (n=59; 29,6%), N3 (n=51; 25,6%). Gesamtkollektiv (n=199).

Bei Patienten ohne Fernmetastasen liegt der Anteil an Kapseldurchbrüchen bei 32,5% (n=83), bei Patienten mit Fernmetastasen (M1) bei 47% (n=44) (vgl. Abbildung 26). Dieser Unterschied ist mit einem p-Wert von 0,067 nicht signifikant; kann jedoch als klare Tendenz gewertet werden.

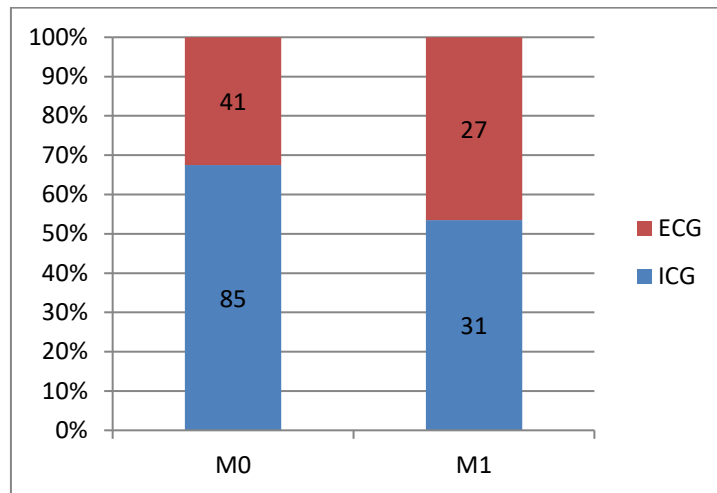


Abb. 26: Überblick über die prozentuale Verteilung des extranodalen Wachstums in Abh. Vom M-Stadium. ECG= extrakapsuläres Wachstum, ICG= intrakapsuläres Wachstum. M0 (n=126; 68,5%), M1 (n=58; 31,5%). Gesamtkollektiv (n=184).

b. Abhängigkeit des ECG vom Vorhandensein einer Lymphangiosis carcinomatosa

Bei insgesamt 143 der 199 Fälle konnte eine Lymphgefäßinvasion beobachtet werden. Der Anteil der extrakapsulär befallenen Lymphknoten lag hier bei 42%, wohingegen er bei den Fällen ohne Lymphangiose nur bei 23% lag (p=0,014).

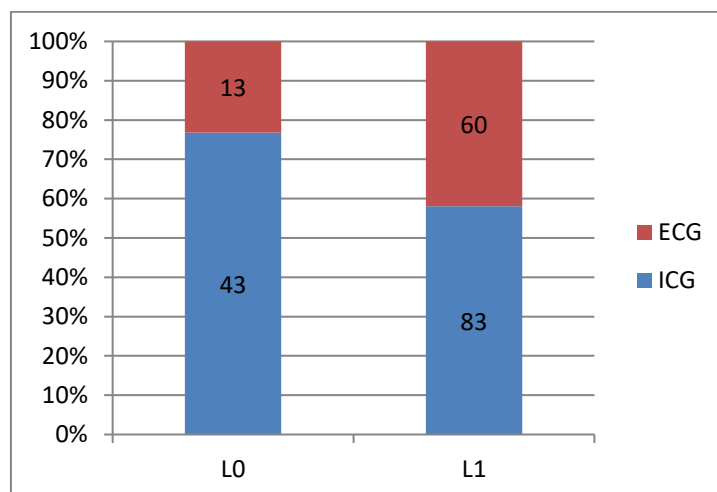


Abb. 27: Überblick über die prozentuale Verteilung des extranodalen Wachstums in Abh. vom Vorhandensein einer Lymphangiose. ECG= extrakapsuläres Wachstum, ICG= intrakapsuläres Wachstum. L0 (n=56; 28,1%), L1 (n=143; 71,9%). Gesamtkollektiv (n=199).

c. Abhängigkeit des ECG vom Grading des Tumors und vom Resektionsrand

31 Patienten wurden als G2 eingestuft, davon konnte bei 7 ein extrakapsulärer Lymphknotenbefall nachgewiesen werden. 162 Patienten wurden als G3 klassifiziert, der Anteil eines Kapseldurchbruchs lag hier bei 39% (vgl. Abbildung 28). Der Unterschied ist statistisch nicht signifikant ($p=0,2$).

Aufgrund der geringen Anzahl der G1-klassifizierten Tumore ($n=2$) beschränkt sich die nachfolgende Graphik auf die Darstellung der G2- und G3-Karzinome.

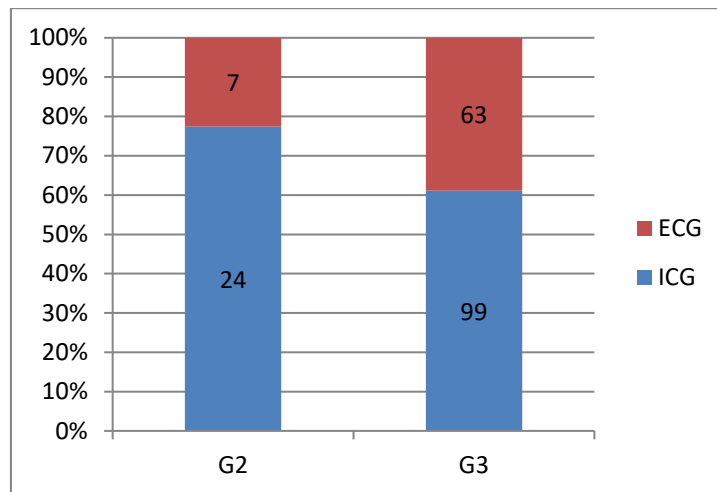


Abb. 28: Überblick über die prozentuale Verteilung des extranodalen Wachstums in Abh. vom Grading des Tumors. ECG= extrakapsuläres Wachstum, ICG= intrakapsuläres Wachstum. G2 ($n=31$; 16,1%), G3 ($n=162$; 83,9%). Gesamtkollektiv ($n=193$).

Auch der Residualtumor (R-Stadium) korreliert mit dem ECG ($p=0,047$). Bei 69% ($n=118$) der als R0 klassifizierten Tumoren wurde ein rein intrakapsulärer LK Befall festgestellt, wohingegen es bei den R1 rezidierten Tumoren noch 46% ($n=35$) waren (vgl. Abbildung 29). Die R2-Fälle können hier aufgrund der geringen Anzahl ($n=5$) nur bedingt gewertet werden.

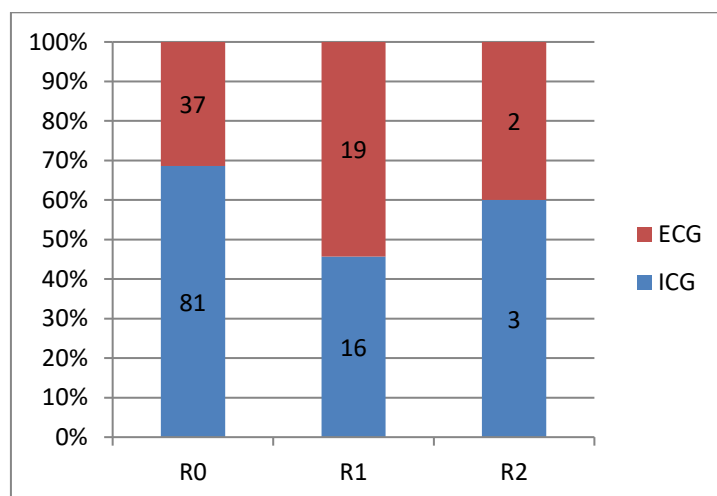


Abb. 29: Überblick über die prozentuale Verteilung des extranodalen Wachstums in Abh. vom Resektionsrand (R-Stadium) des Tumors. ECG= extrakapsuläres Wachstum, ICG= intrakapsuläres Wachstum. R0($n=118$; 74,7%), R1 ($n=35$; 22,2%), R2 ($n=5$; 3,1%)Gesamtkollektiv ($n=158$).

d. Abhängigkeit des ECG von der Lauren-Klassifikation

Der Anteil der Patienten mit extrakapsulär befallenen Lymphknoten korreliert nicht nur mit dem Tumorstadium, sondern auch mit der Lauren-Klassifikation. Der Unterschied ist zwar statistisch nicht signifikant ($p=0,059$), der Anteil des ECG beim diffusen Typ ist jedoch deutlich höher als beim intestinalen Typ.

Beim intestinalen Typ lag der Anteil mit ECG nur bei 31% ($n=108$) wohingegen beim diffusen Typ ($n=69$) nahezu jeder zweite Fall ein kapselüberschreitendes Wachstum aufwies (48%) (vgl. Abbildung 30).

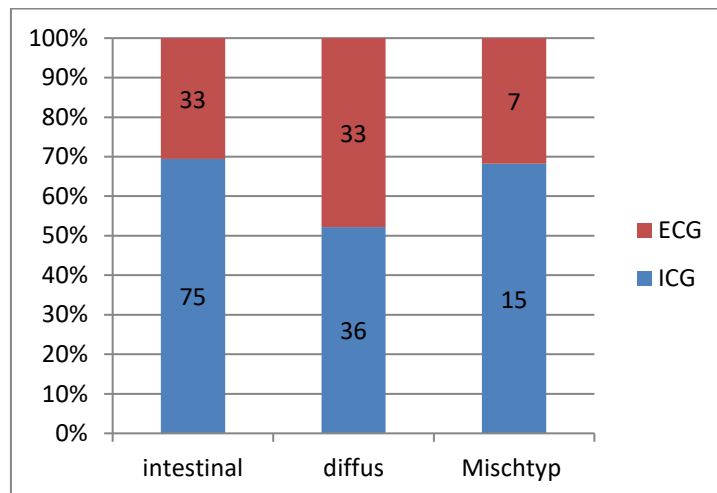


Abb. 30: Überblick über die prozentuale Verteilung des extranodalen Wachstums in Abh. von der Lauren-Klassifikation. ECG= extrakapsuläres Wachstum, ICG= intrakapsuläres Wachstum. Intestinaler Typ ($n=108$; 54,2%), diffuser Typ ($n=69$; 34,7%), Mischtyp ($n=22$; 11,1%). Gesamtkollektiv ($n=199$).

e. Anteil des ECG in Abhängigkeit vom Regressionsgrad nach Becker

Insgesamt wurden 59 Patienten vorththerapiert. Von einem der 59 Fälle konnten die notwendigen histologischen Präparate der Primärtumoren nicht vollständig gesammelt werden und folglich auch der Regressionsgrad nach Becker nicht bestimmt werden. Die nachfolgenden Berechnungen wurden somit in Bezug auf 58 Patienten vorgenommen.

Bei 5 der 58 vorththerapierten Patienten konnten keine vitalen Tumorzellen mehr nachgewiesen werden. Von diesen 5 als Regressionsgrad 1a nach Becker klassifizierten Patienten wurde lediglich bei einem extrakapsuläres Wachstum festgestellt.

Von den als 1b klassifizierten Fällen ($n=8$) wurden insgesamt 5 als ECG eingestuft, bei den Regressionsgraden 2 und 3 nach Becker waren es jeweils 42% ($n=19$ bzw. $n=26$). Der Anteil der Kapseldurchbrüche unterscheidet sich in den Gruppen nicht signifikant ($p=0,42$).

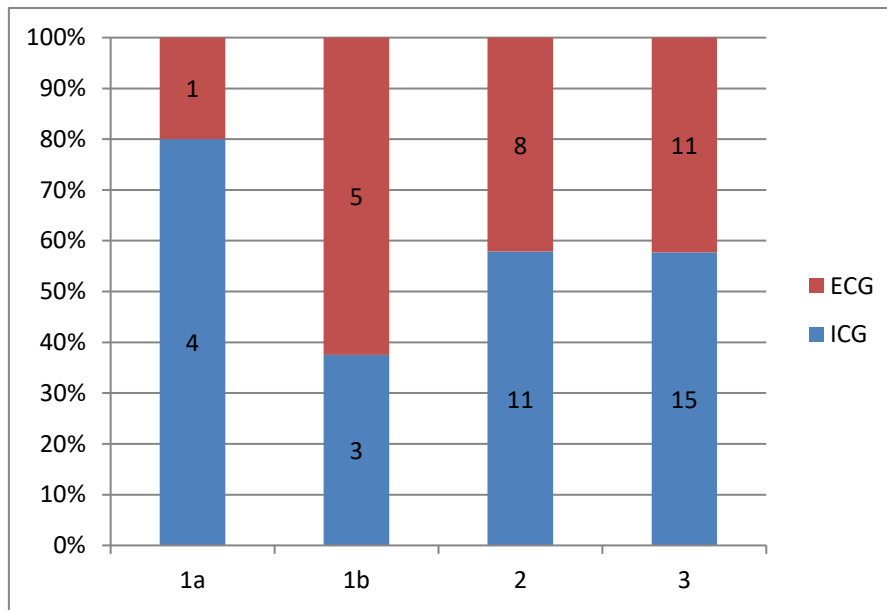


Abb. 31: Überblick über die Verteilung des extrakapsulären Wachstums bei den vorthera-pierten Patienten in Abhängigkeit vom Regressionsgrad n. Becker. 1a (n=5), 1b (n=8), 2 (n=19), 3 (n=26). Gesamtkollektiv (n=58). Aufgrund der geringen Fallzahl kann die prozentuale Angabe nur als Tendenz gewertet werden.

4.2 Biomarker

4.2.1 Auswertung der Immunhistochemie

a. MLH1

Die nukleäre Expression von MLH1 wurde notiert. Es wurde letztlich evaluiert, ob im Präparat angefärbte Tumorzellen vorhanden waren (1), oder nicht (0). In der Kontrollgruppe konnten zwei Präparate nicht korrekt angefärbt werden, die Gruppengröße beträgt daher 16.

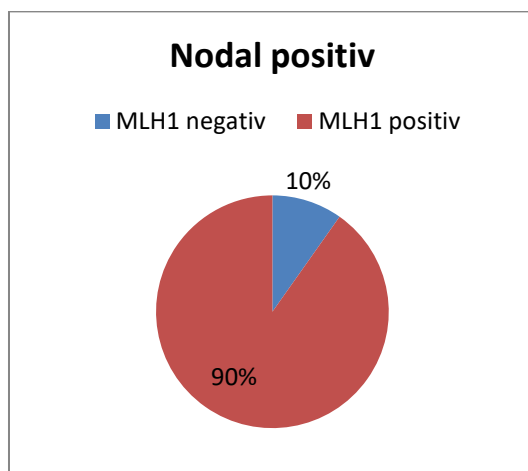


Abb. 32: Nodal positive Fälle. Verteilung der als MLH1 positiv und negativ gewerteten Fälle. MLH1 negativ (n=19; 10%), MLH1 positiv (n=175; 90%). Gesamtkollektiv (n=194).

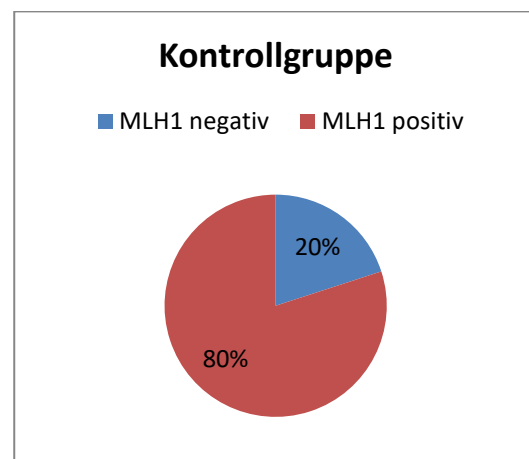


Abb. 33: Kontrollgruppe. Verteilung der als MLH1 positiv und negativ gewerteten Fälle. MLH1 negativ (n=3; 20%), MLH1 positiv (n=12; 80%). Gesamtkollektiv (n=15).

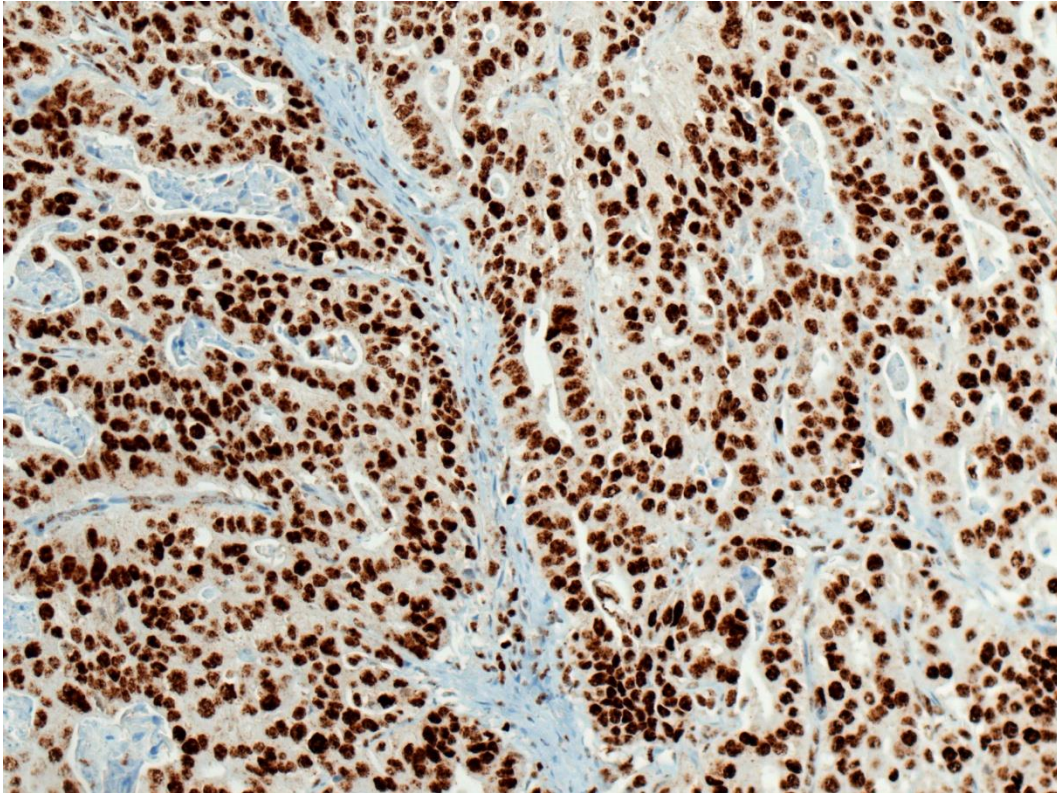


Abb. 34: *MLH1-positiver Fall in 20-facher Vergrößerung. Man erkennt die drüsig formierten Tumorzellen, deren Zellkerne durch den MLH1 Antikörper tief braun angefärbt wurden.*

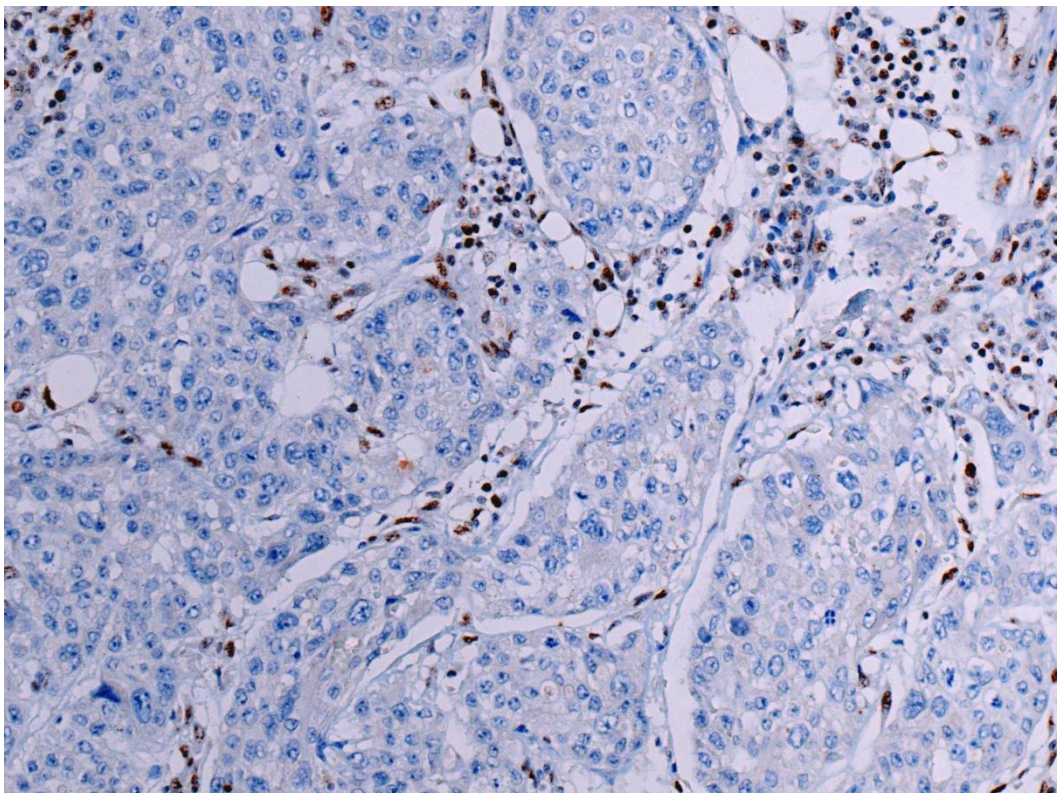


Abb. 35: *MLH1-negativer Fall in 20-facher Vergrößerung. Man erkennt die durch die Gegenfärbung blau angefärbten Tumorzellen und die MLH1 positiven interstitiellen Lymphozyten, welche in den negativen Fällen als endogene Kontrolle dienen.*

b. MSH2

Auch für MSH2 wurde die nukleäre Expression betrachtet. Alle Präparate wiesen eine positive MSH2-Expression auf. In der Kontrollgruppe konnte ein Präparat nicht korrekt angefärbt werden, die Gruppengröße beträgt daher 16.

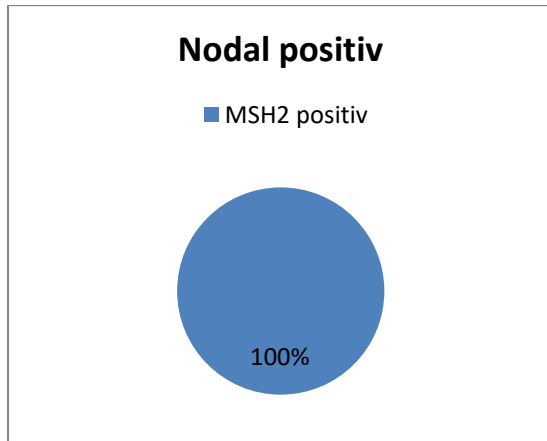


Abb. 36: Alle 194 nodal positiven Fälle wurden als MSH2 positiv gewertet (n=194).

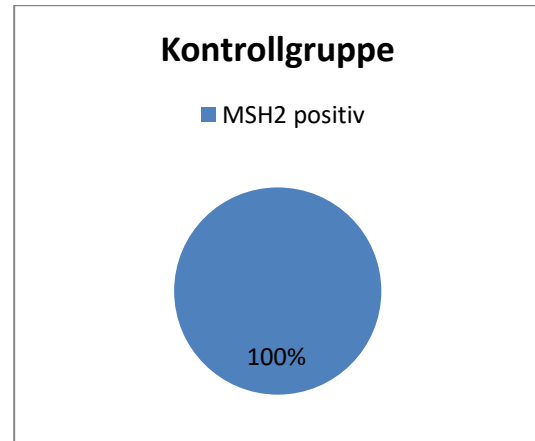


Abb. 37: Kontrollgruppe. Alle 16 Fälle exprimierten MSH2 (n=16).

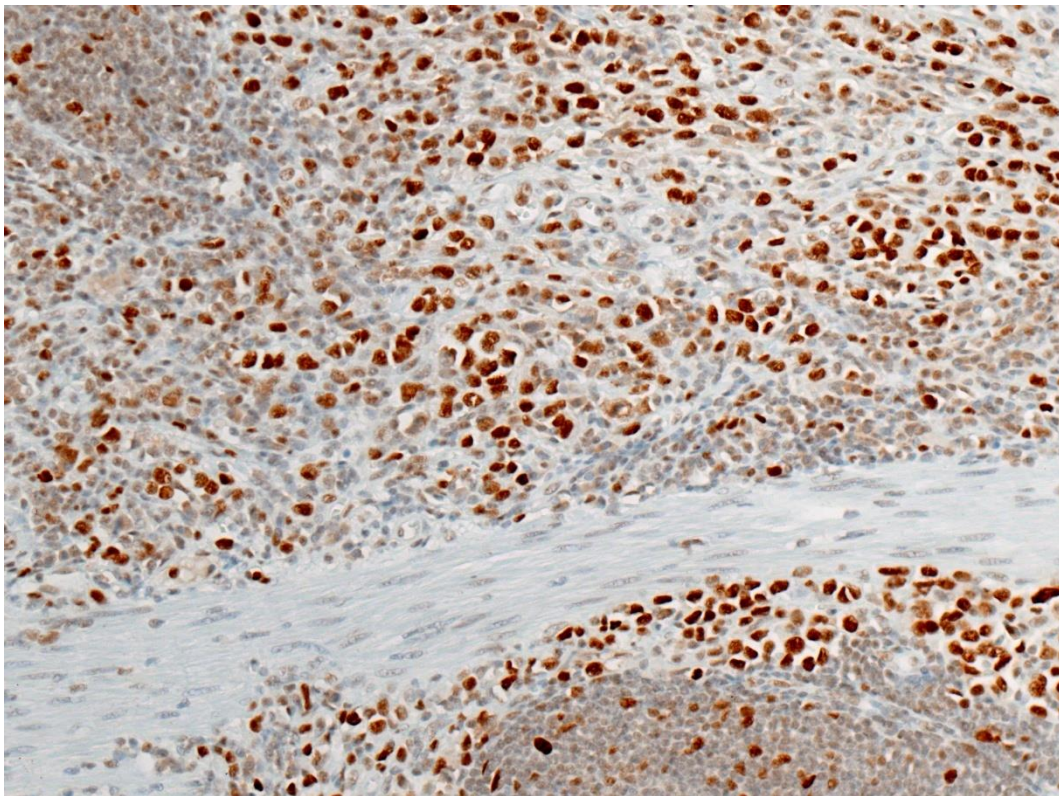


Abb. 38: MSH2 positiver Fall in 20-facher Vergrößerung. Man erkennt die braun angefärbten diffus im Interstitium verteilten Tumorzellkerne.

c. Beta Catenin

Auch für β -Catenin wurde die nukleäre Expression betrachtet. Hier wurde der Prozentsatz der nukleär positiven Tumorzellen im Verhältnis zu allen in einem Präparat vorhandenen Tumorzellen evaluiert. Die Intensität der nukleären Färbung wurde nicht unterschieden. Die Auswertung wurde folgendermaßen durchgeführt: negativ – 0; <30% -1+; 30-60%- 2+; >60% positive Zellen- 3+. Für die nachfolgende statistische Auswertung wurden die Fälle in ‚low grade‘ (Bewertung 0 und 1) und ‚high grade‘ (Werte 2 und 3) eingeteilt.

In der Kontrollgruppe konnten vier Präparate nicht korrekt angefärbt werden. Die Kontrollgruppe beträgt deshalb für β -Catenin n=13.

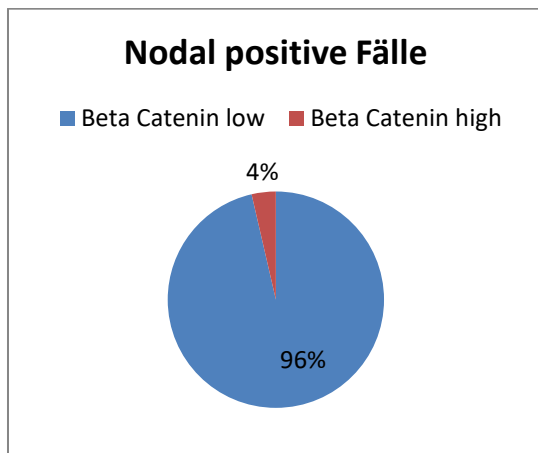


Abb. 39: Ergebnis der β -Catenin IHC: β -Catenin ‚low positive‘ (n=187; 96%), β -Catenin ‚high positive‘ (n=7; 4%). Gesamtkollektiv (n=194).

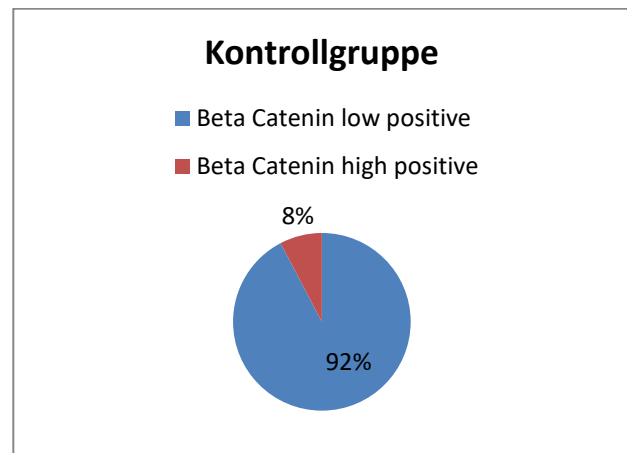


Abb. 40: Ergebnis der β -Catenin IHC: β -Catenin ‚low positive‘ (n=12; 92%), β -Catenin ‚high positive‘ (n=1; 8%). Gesamtkollektiv (n=13).

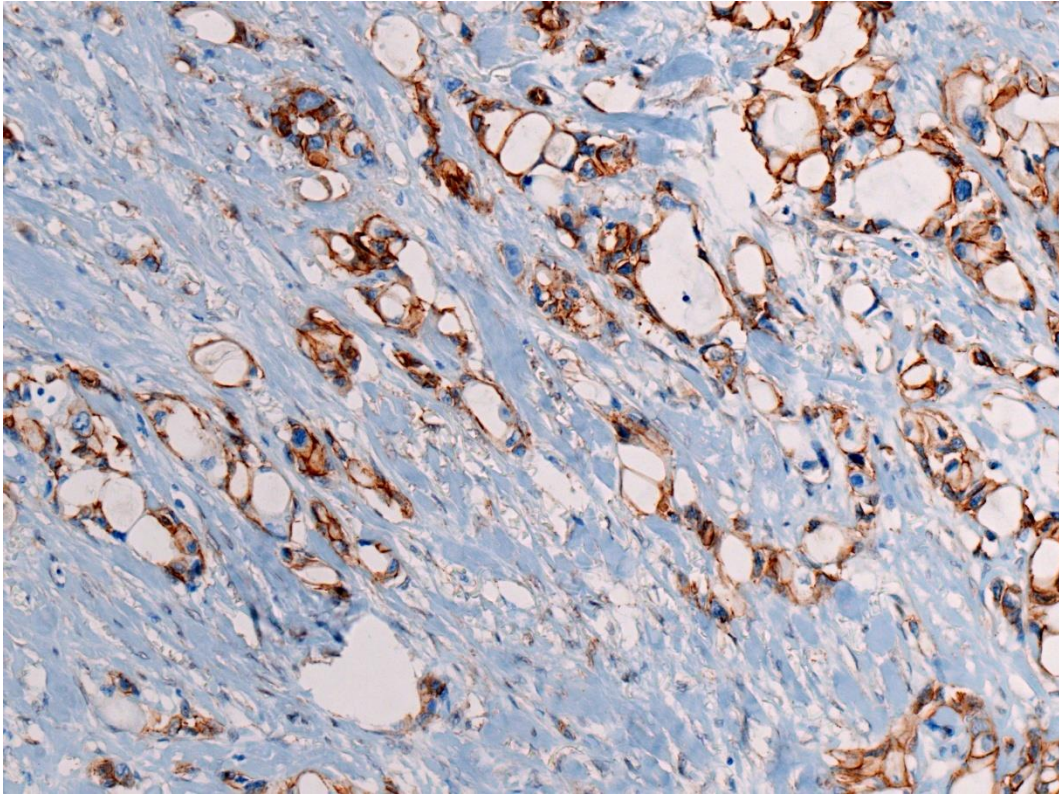


Abb. 41: β -Catenin negativer Fall in 20-facher Vergrößerung. Die Karzinomzellen sind nukleär nicht angefärbt (blaue Zellkerne). Die erkennbare membranständige Anfärbung dient als endogene Kontrolle.

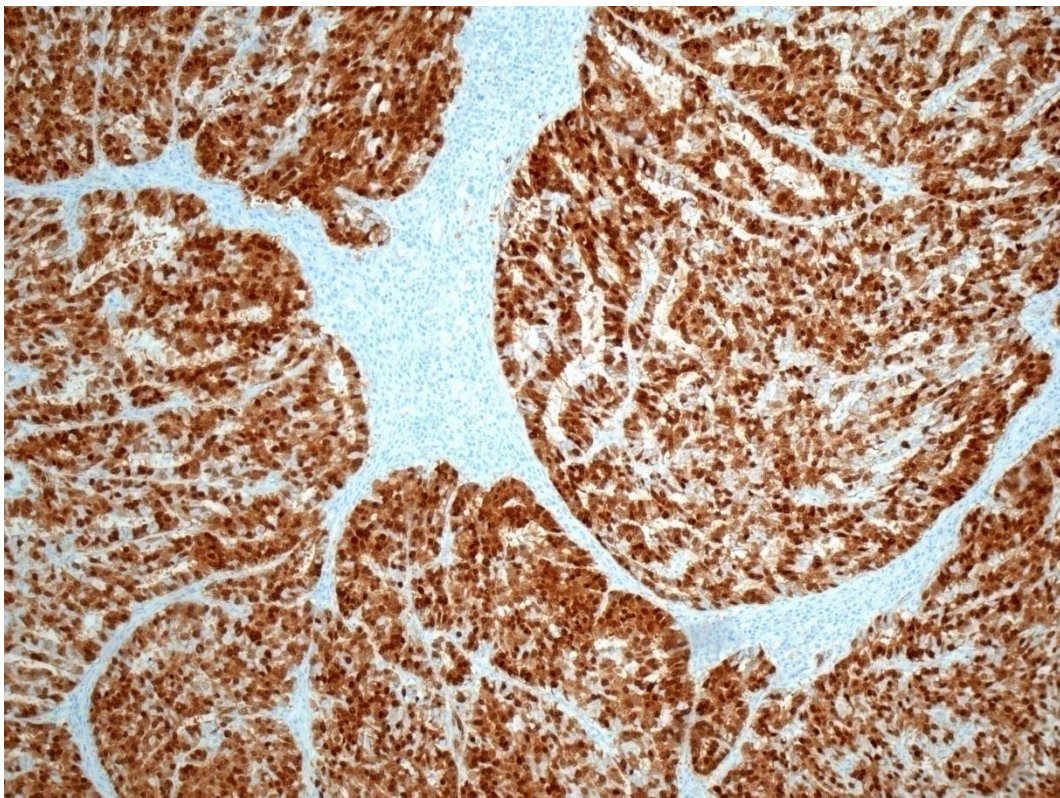


Abb. 42: β -Catenin positives Karzinom mit mehr als 90% positiven Tumorzellen (high grade) in 20-facher (c) Vergrößerung.

d. CD133

CD133 wurde nach dem prozentualen Anteil der positiven Tumorzellen in negativ, ‚low grade‘ (< 50% positive Tumorzellen) und ‚high grade‘ (> 50% positive Tumorzellen) eingeteilt. Die beiden Gruppen negativ und ‚low grade‘ wurden anschließend zusammengefasst, sodass sich folgende Einteilung ergibt: ‚low grade positive‘: 0-<50% der Tumorzellen positiv, ‚high grade positive‘: >50% der Tumorzellen positiv.

Die Tumorzellen zeigen eine Positivität der apikalen Zelldomäne und eine Positivität der intraluminalen Debrisniederschläge. Das Zytoplasma und die Zellkerne hingegen sind in der CD133-Färbung negativ.

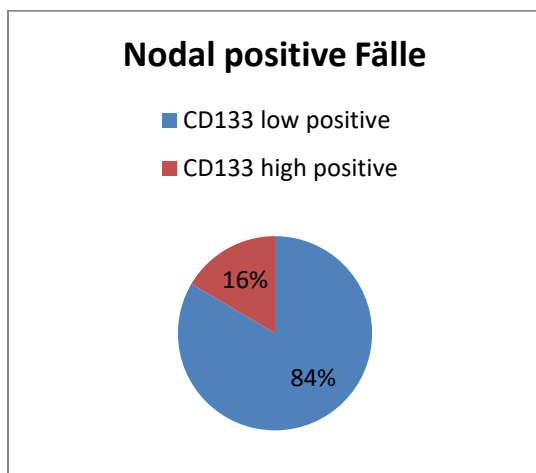


Abb. 43: Verteilung der in der CD133 IHC als ‚low‘ und ‚high‘ positive bewerteten Fälle. ‚low positive‘ (n= 32; 16%), ‚high positive‘ (n= 162; 84%). Gesamtkollektiv (n=194).

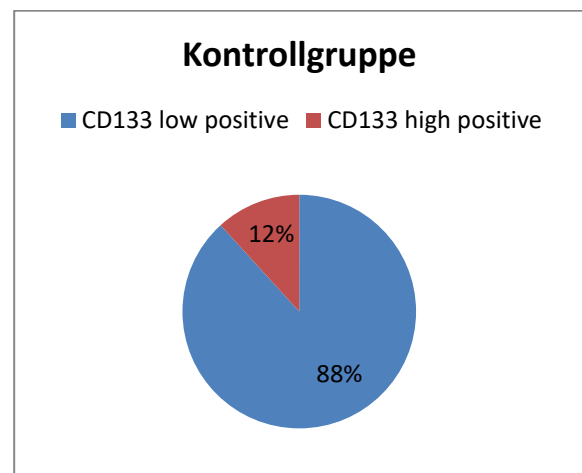


Abb. 44: Kontrollgruppe. Verteilung der in der CD133 IHC als ‚low‘ und ‚high‘ positive bewerteten Fälle. ‚low positive‘ (n= 15), ‚high positive‘ (n= 2). Gesamtkollektiv (n=17).

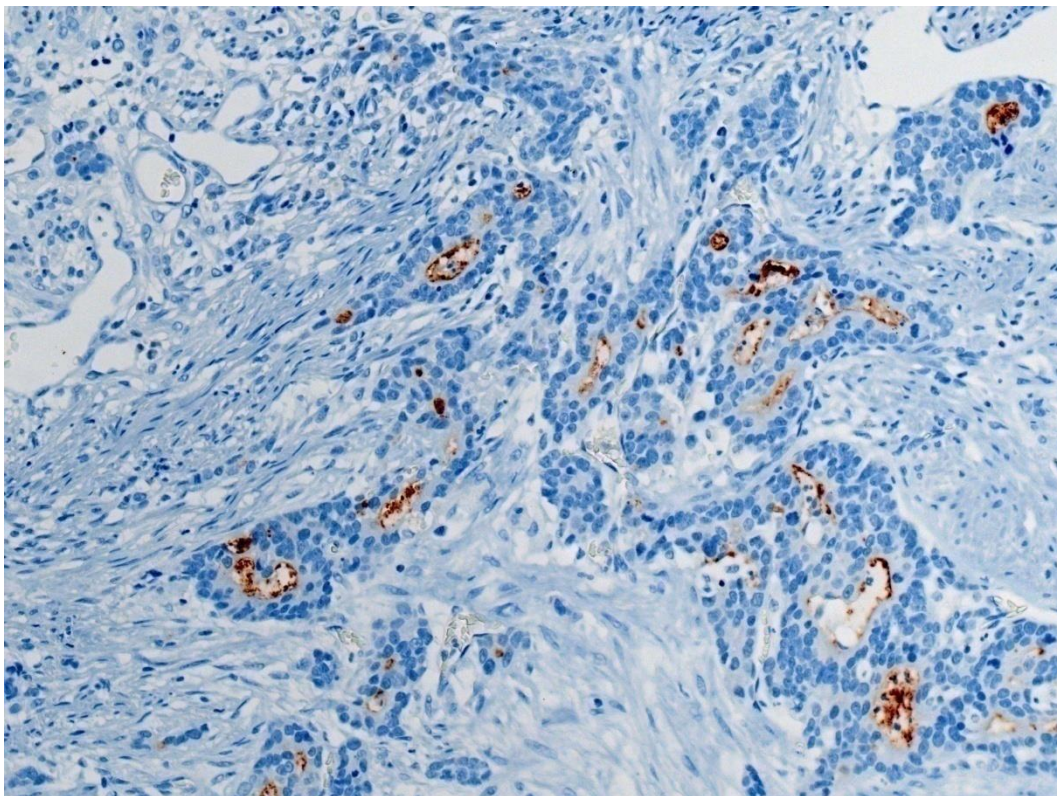


Abb. 45: *CD133 positives Karzinom mit weniger als 50% positiven Tumorzellen in 20-facher Vergrößerung.*

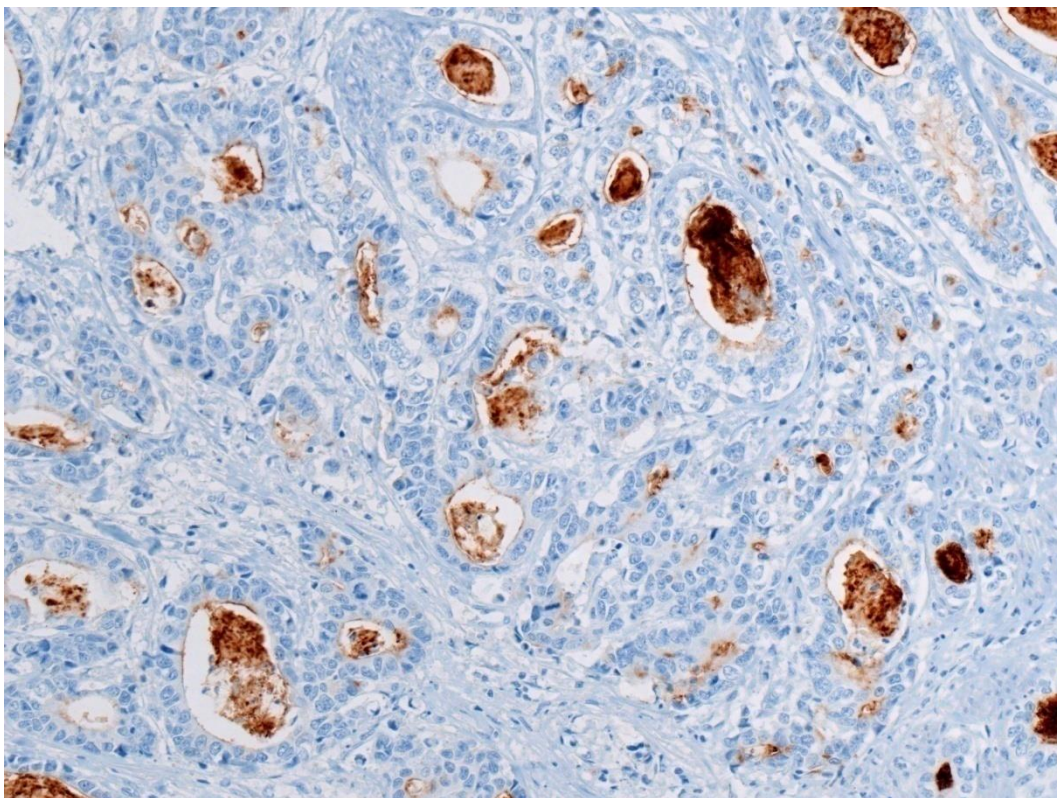


Abb. 46: *CD133 positives Karzinom mit mehr als 50% positiven Tumorzellen in 20-facher Vergrößerung.*

e. SOX2

In dieser Arbeit wurde allein die nukleäre SOX2 Expression betrachtet. Die nukleäre Färbung wurde sowohl auf die Intensität als auch auf den prozentualen Anteil hin untersucht. Die Intensitätswerte wurden wie folgt evaluiert: keine Färbung- 0, schwache Färbung- 1, moderate Färbung- 2, starke Färbung- 3. Wenn weniger als 10% der Tumorzellen nukleär angefärbt waren oder wenn die Färbung als 0 oder 1 eingestuft wurde, wurde die Immunfärbung als negativ eingestuft.

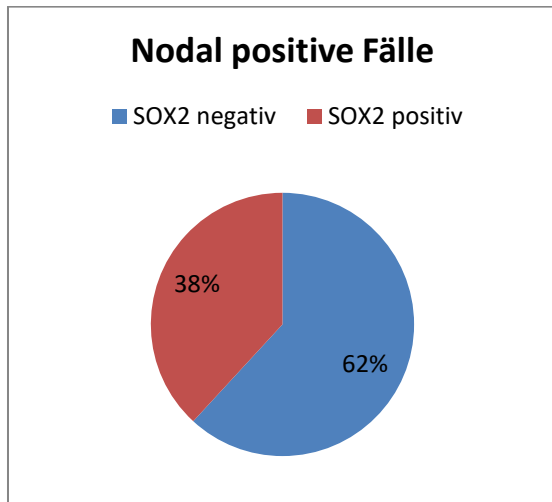


Abb. 47: Anteil der als SOX2-positiv und negativ gewerteten Fälle. SOX2 positiv (n= 74; 38%), SOX2 negativ (n=120; 62%), Gesamtkollektiv (n=194).

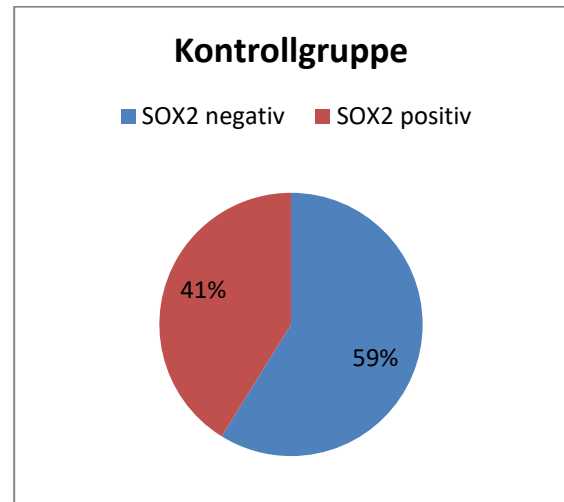


Abb. 48: Anteil der als SOX2-positiv und negativ gewerteten Fälle. SOX2 positiv (n= 7; 41%), SOX2 negativ (n=10; 59%), Gesamtkollektiv (n=17).

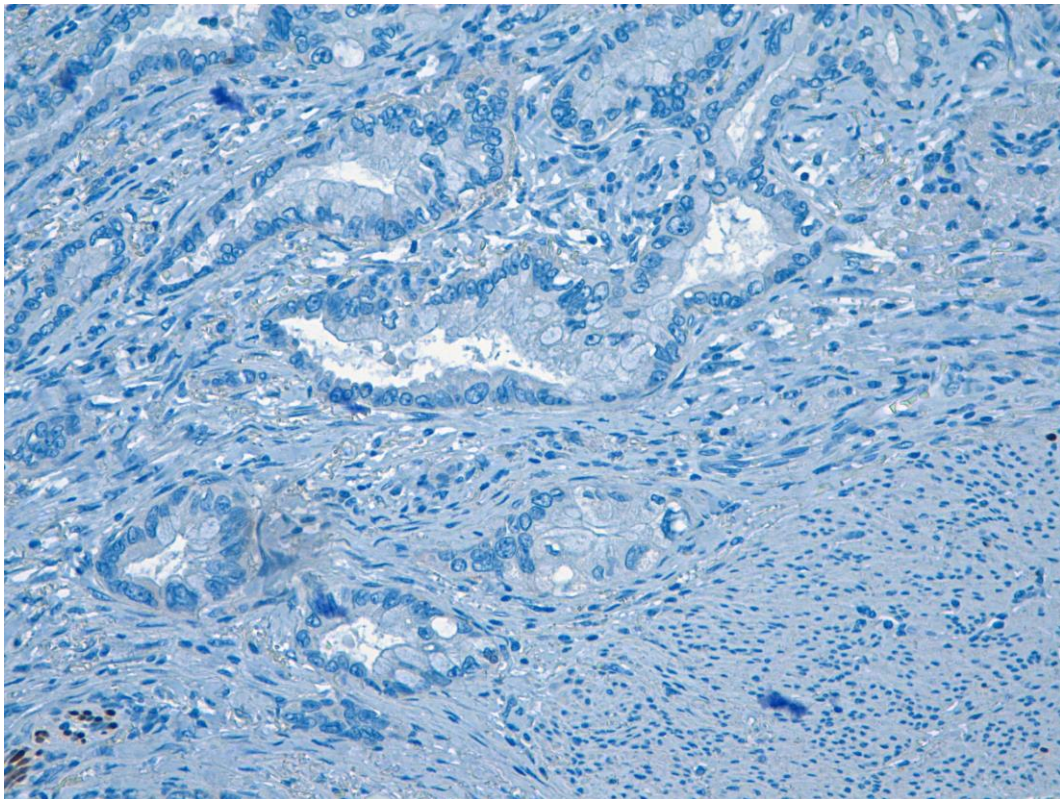


Abb. 49: SOX2-negativer Fall in 20-facher Vergrößerung. Die drüsig formierten Tumorzellen sind durch die Gegenfärbung blau angefärbt. Als endogene Kontrolle dienen die braun angefärbten Lymphozyten in der linken unteren Ecke.

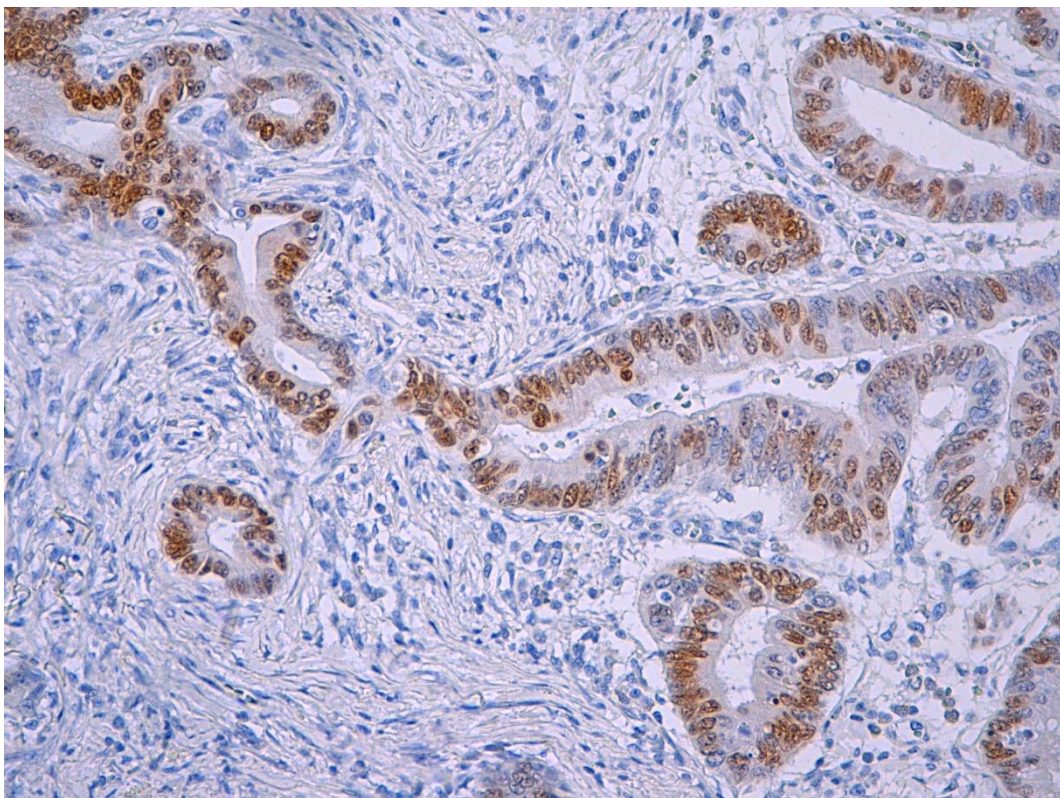


Abb. 50: SOX2-positiver Fall in 20-facher Vergrößerung. Die drüsig formierten Tumorzellen sind braun angefärbt.

f. SOX9

Wie für SOX2 wurde auch für SOX9 die nukleäre Expression betrachtet. Die Fälle wurden nach Intensität und prozentualem Anteil der positiven Zellen eingeteilt. Der Cut Off wurde bei 30% positive Tumorzellen gesetzt (0-30% positiv: low grade positive, >30% positiv: high grade positive).

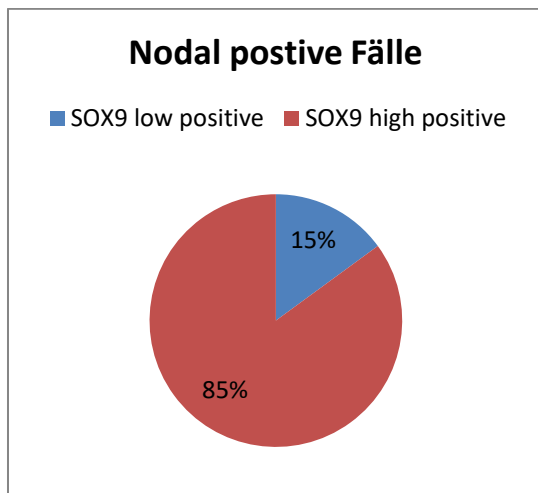


Abb. 51: Anteil der nodal positiven, als SOX9-stark (high) und schwach (low) positiv gewerteten Fälle. SOX9 ‚high positive‘ (n= 165; 85%), SOX9 ‚low positive‘ (n=29; 15%), Gesamtkollektiv (n=194).

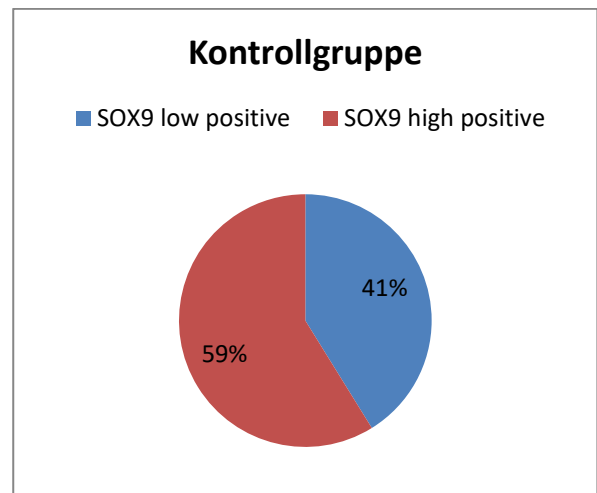


Abb. 52: Anteil der in der Kontrollgruppe als SOX9-stark (high) und schwach (low) positiv gewerteten Fälle. SOX9 ‚high positive‘ (n= 10; 59%), SOX9 ‚low positive‘ (n=7; 41%), Gesamtkollektiv (n=17).

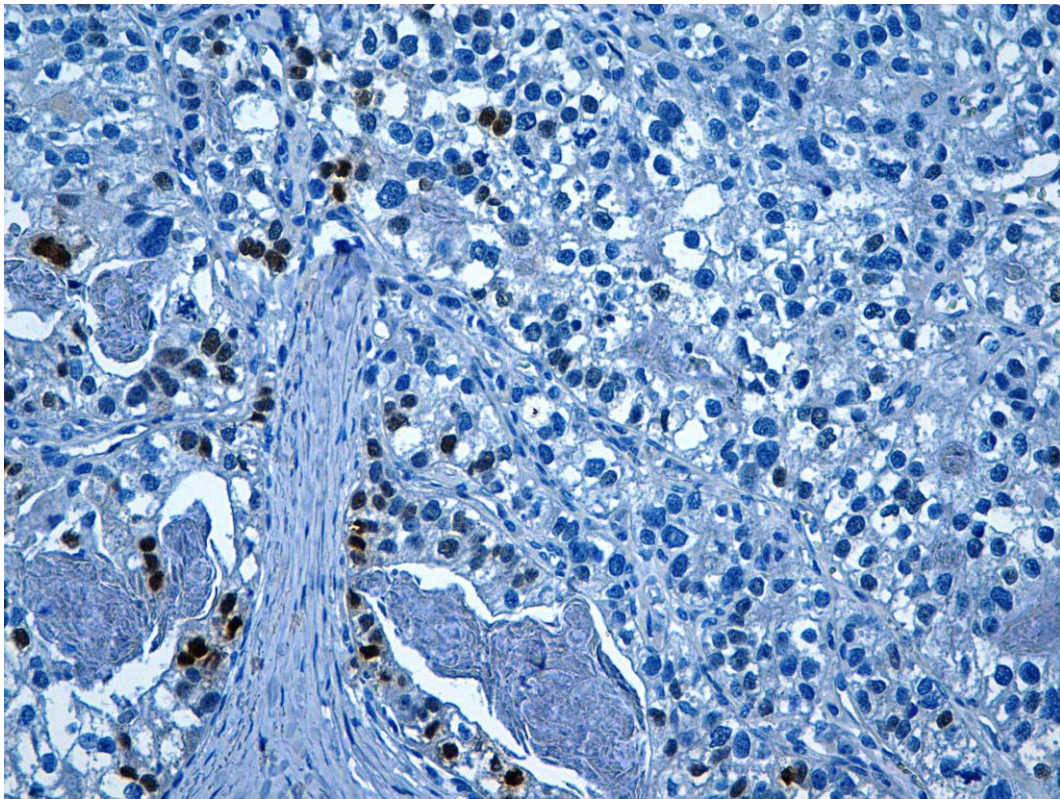


Abb. 53: SOX9-positiver Fall mit weniger als 30% positiven Tumorzellen (low grade positive) in 20-facher Vergrößerung.

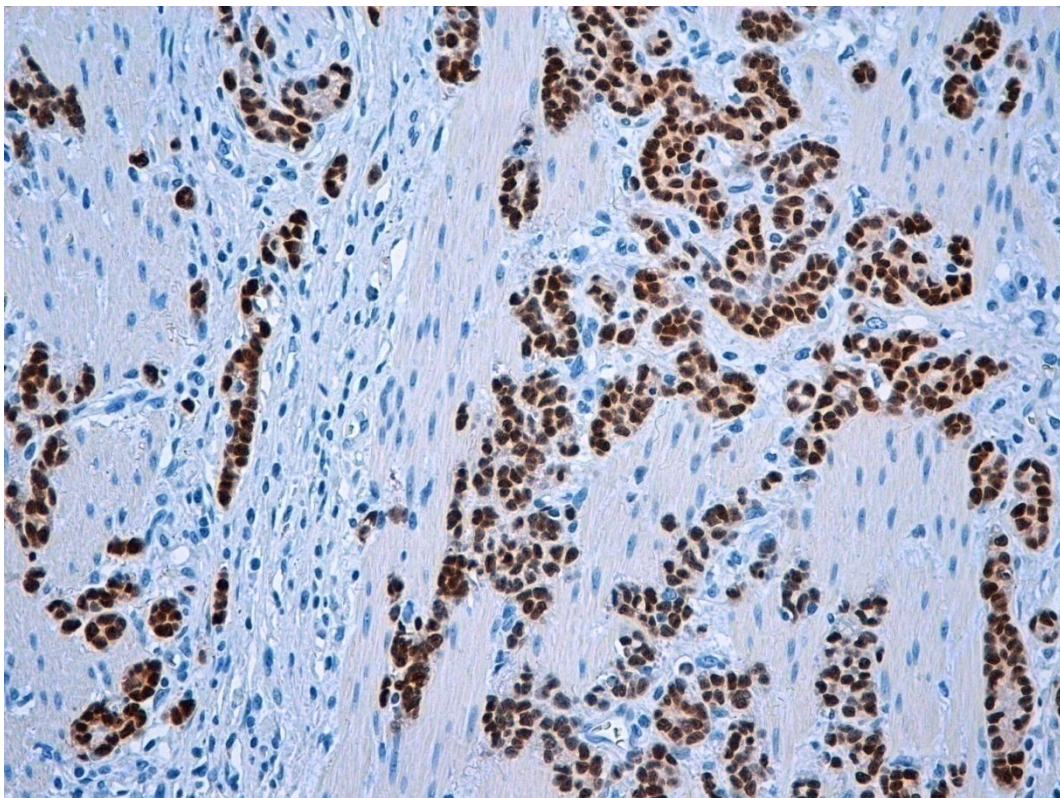


Abb. 54: SOX9-positiver Fall mit mehr als 30% positiven Tumorzellen (high grade positive) in 20-facher Vergrößerung.

4.2.2 Immunhistochemische Marker und extranodales Wachstum sowie deren Einfluss auf das Überleben

a. MLH1

Der Anteil der MLH1 positiven Fälle lag bei 90% (n=175), bei 10% konnte keine MLH1 Expression nachgewiesen werden (n=19) (vgl. Abbildung 55). In der Kontrollgruppe (n=15) wiesen 12 eine MLH1-Expression auf, drei hingegen nicht. Der Chi-Square Test ergab keinen signifikanten Unterschied in der MLH1-Expression der beiden Gruppen (p= 0,21).

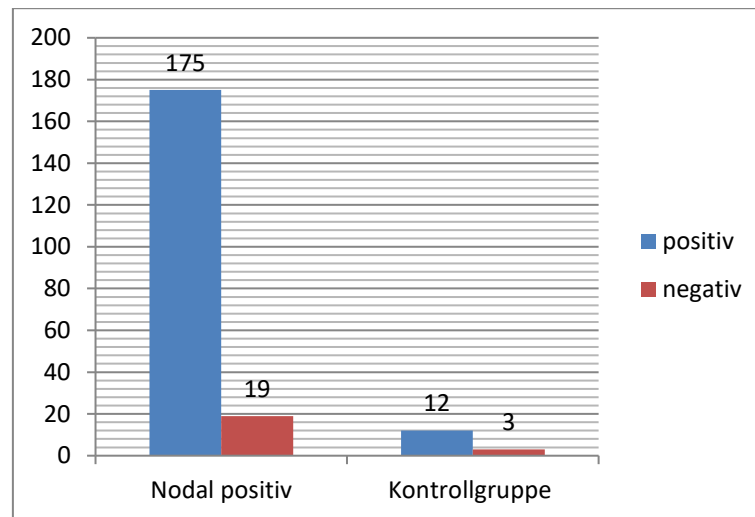


Abb. 55: Verteilung der als MLH1 positiv und negativ gewerteten Fälle bei den nodal positiven Fällen und der Kontrollgruppe. Nodal Positive Fälle: MLH1 negativ (n=19; 10%), MLH1 positiv (n=175; 90%). Kontrollgruppe: MLH1 negativ (n=3; 20%), MLH1 positiv (n=12; 80%). Gesamtkollektiv (n=209).

Es konnte kein signifikanter Unterschied der MLH1 Expression in den beiden Gruppen ECG vs. ICG festgestellt werden (p=0,48). Der Anteil der MLH1 negativen Fälle lag bei der Gruppe ‚ECG‘ bei 7%, bei der Gruppe ‚ICG‘ bei 11% (vgl. Abbildung 56).

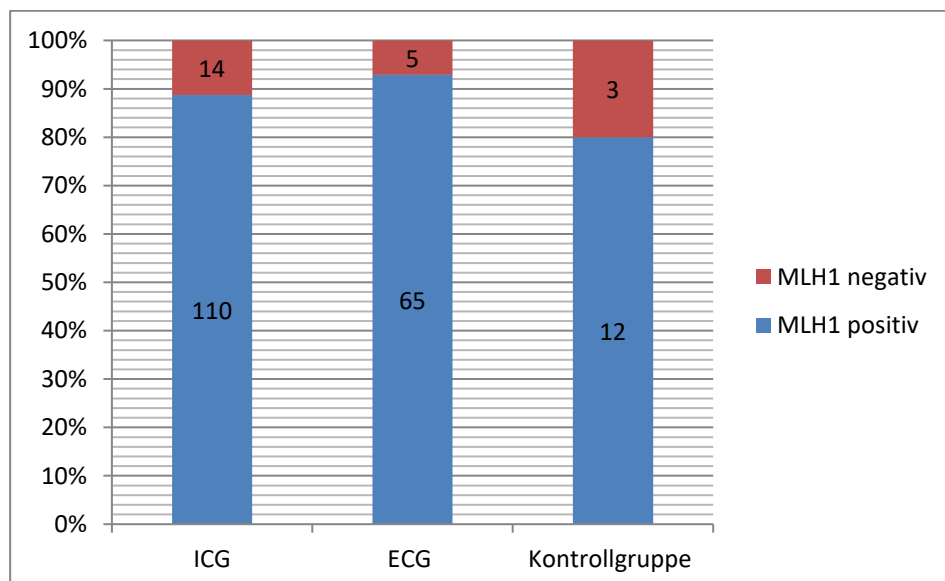


Abb. 56: Überblick über die Verteilung der MLH1 IHC-Ergebnisse in Abhängigkeit vom ECG. ECG= extrakapsuläres Lymphknotenwachstum, ICG= ausschließlich intrakapsuläres LK-Wachstum. Es konnte kein signifikanter Unterschied der MLH1-Expression in der ECG-, ICG- und Kontrollgruppe festgestellt werden.

Im anschließenden Vergleich der kumulativen Überlebensdauer in Abhängigkeit der MLH1 Expression konnte kein Unterschied festgestellt werden ($p=0,13$) (vgl. Abbildung 57).

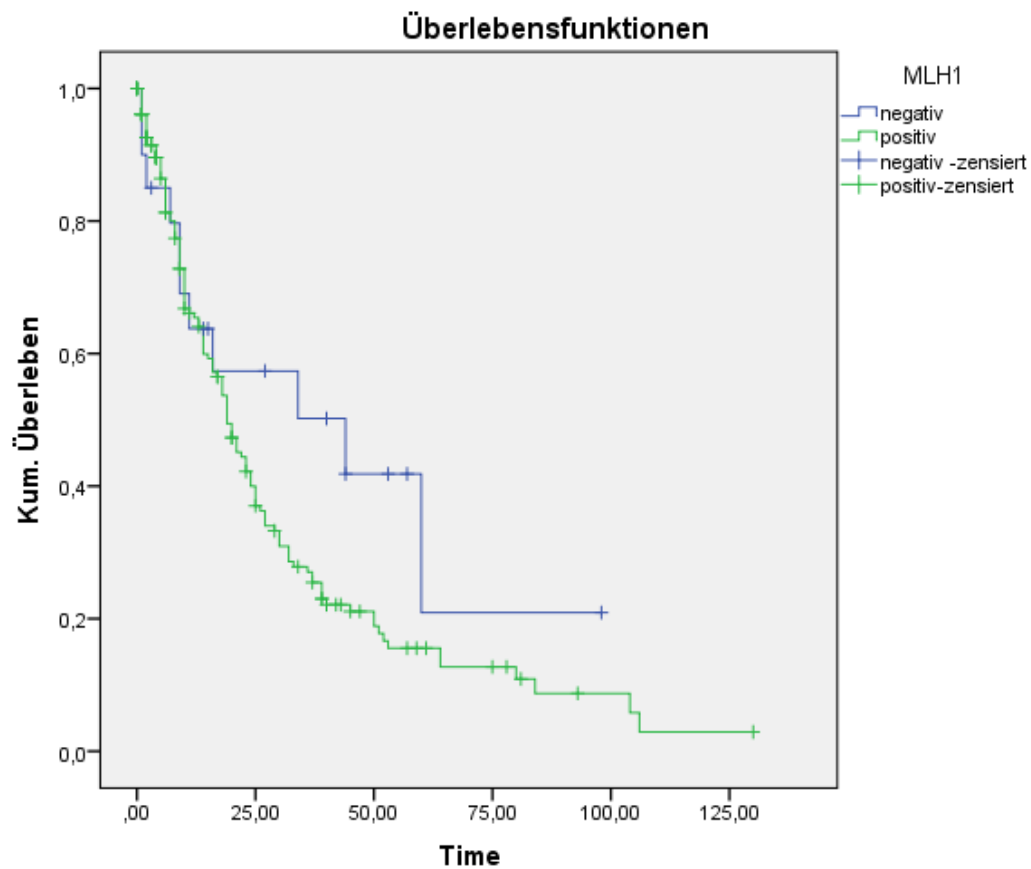


Abb. 57: Magenkarzinom. Kumulatives Überleben nodal positiver Fälle in Abhängigkeit der MLH1-Expression. MLH1 negativ ($n=21$; 11 Ereignisse, 10 Zensierungen), MLH1 positiv ($n=185$; 126 Ereignisse, 59 Zensierungen). Gesamtkollektiv ($n=206$, 137 Ereignisse, 69 Zensierungen).

b. MSH2

Alle 194 nodal positiven Fälle waren in der Immunhistochemie MSH2 positiv, auch die 16 Fälle der Kontrollgruppe wiesen durchgehend eine erhaltene MSH2-Expression auf (vgl. Abbildung 58).

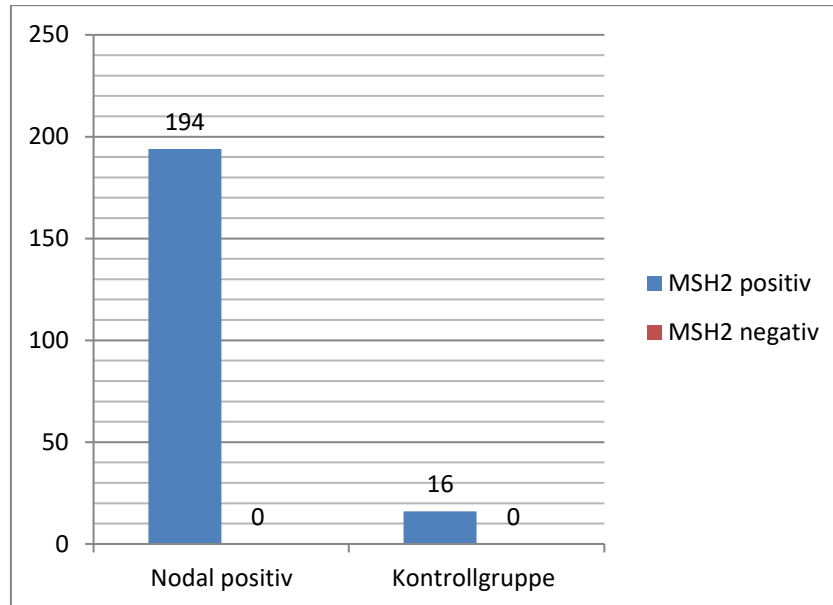


Abb. 58: Darstellung des Ergebnisses der IHC für MSH2. Sowohl die nodal positiven Fälle (n=194) als auch die Kontrollgruppe (n=16) wurden als MSH2-positiv bewertet.

c. Beta Catenin

Der Großteil der untersuchten Fälle hatte eine geringe oder fehlende β -Catenin Expression. 187 der nodal positiven Fälle wurden als ‚low positive‘ eingeteilt, lediglich 7 wiesen eine starke β -Catenin Expression auf. In der Kontrollgruppe wies nur ein Karzinom eine hohe β -Catenin Expression auf, die restlichen 12 wiesen eine geringe Expression auf. Die beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant in der β -Catenin Expression ($p=0,46$).

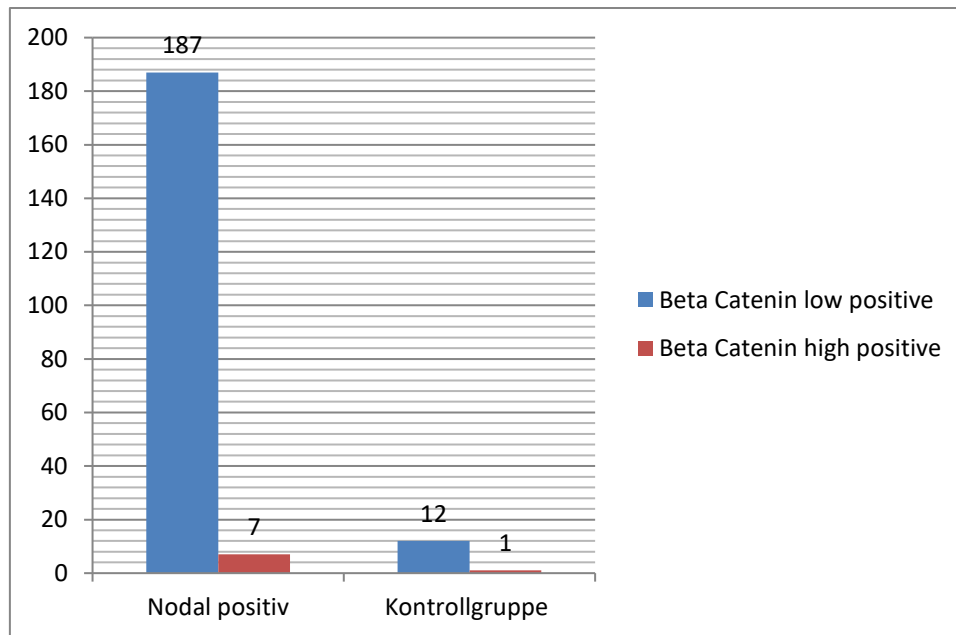


Abb. 59: Verteilung der als β -Catenin ,high-' und ,low positive' gewerteten Fälle. Nodal positive Fälle (n=194): β -Catenin 'low positive' (n=187; 96%), β -Catenin ,high positive' (n=7; 4%). Kontrollgruppe: 'low positive' (n=12), 'high positive' (n=1).

Die β -Catenin Expression korreliert nicht mit dem Vorhandensein eines Lymphknoten-Kapseldurchbruchs ($p=0,22$). Der Anteil der ,high positive' Fälle lag bei der ICG-Gruppe bei 4,8% (5/124), in der ECG-Gruppe bei 1,4% (1/70).

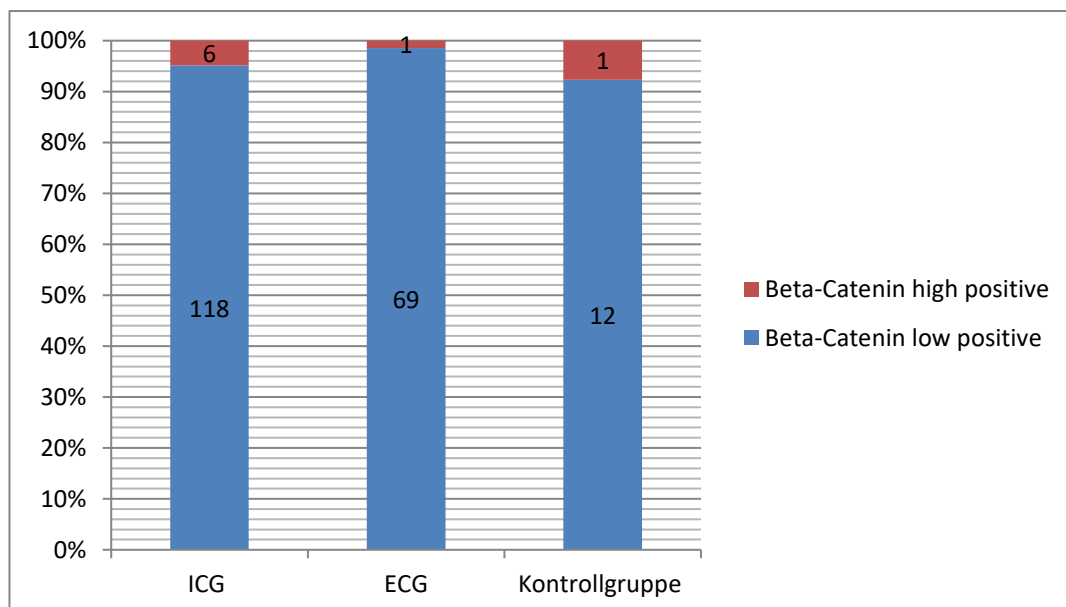


Abb. 60: β -Catenin Expression in Abhängigkeit vom ECG. ECG= extrakapsuläres Lymphknotenwachstum, ICG= ausschließlich intrakapsuläres LK-Wachstum. Es konnte kein signifikanter Unterschied in den Gruppen festgestellt werden.

Zusätzlich wurde unabhängig vom extranodalen Lymphknotenwachstum das kumulative Überleben der Gruppen ‚high positive‘ und ‚low positive‘ verglichen, um einen Einfluss der β -Catenin Expression auf die Prognose beim Magenkarzinom zu untersuchen (vgl. Abbildung 61). Dabei konnte kein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen festgestellt werden ($p=0,46$).

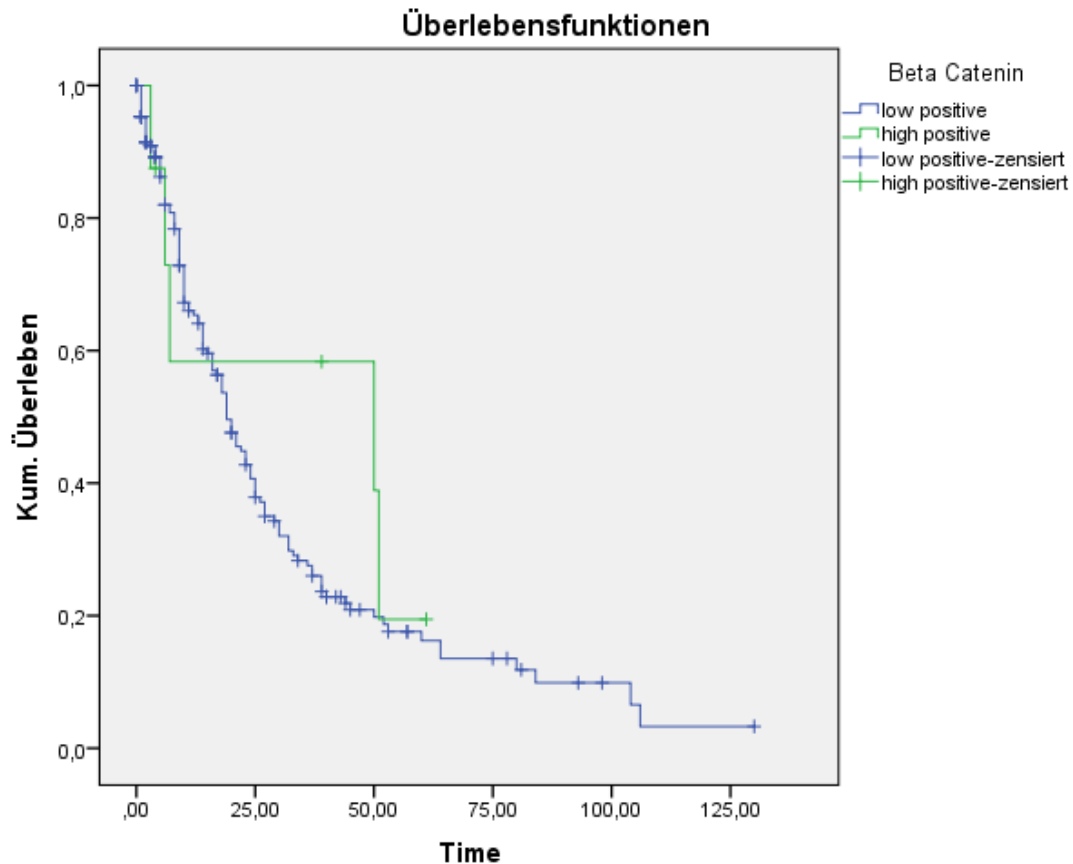


Abb. 61: Magenkarzinom. Kumulatives Überleben nodal positiver Fälle in Abhängigkeit der β -Catenin-Expression. β -Catenin ‚low-positive‘ (n=196; 132 Ereignisse, 64 Zensierungen), β -Catenin ‚high-positive‘ (n=8; 5 Ereignisse, 3 Zensierungen). Gesamtkollektiv (n=204, 137 Ereignisse, 67 Zensierungen).

d. CD133

Die meisten Karzinome wiesen eine geringe CD133 Expression auf. 85% der nodal positiven Fälle wurden als ‚low positive‘ eingestuft (n=162), bei 15% konnte eine gesteigerte CD133-Expression nachgewiesen werden (n=32). In der Kontrollgruppe wies der Großteil ebenfalls eine geringe CD133-Expression auf (15 von 17), bei nur 2 der 17 Fälle wurde eine gesteigerte CD133-Expression nachgewiesen ($p=0,61$).

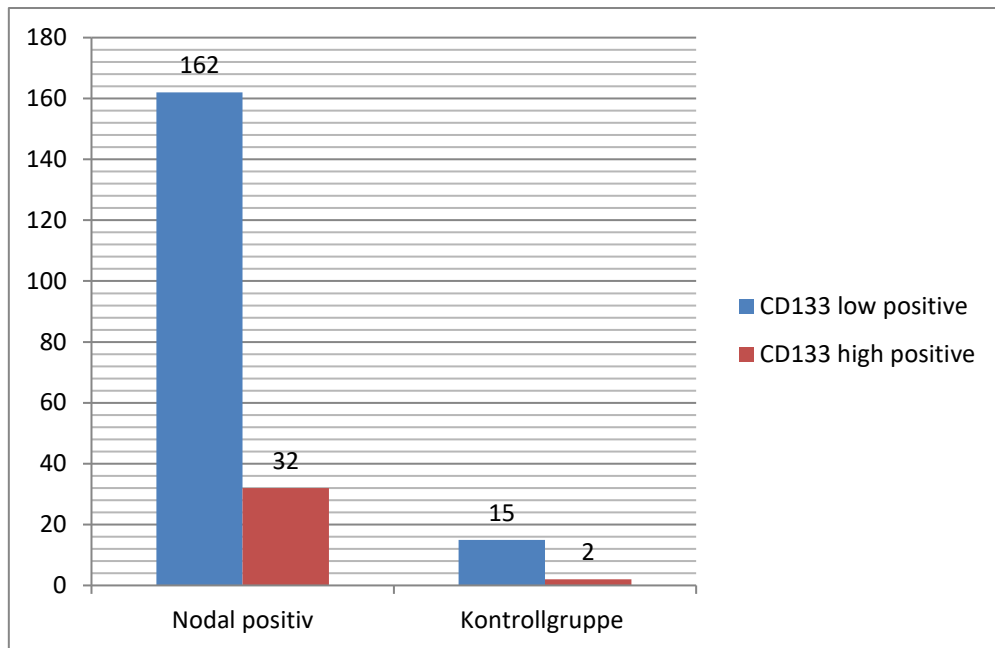


Abb. 62: Verteilung der als CD133 ‚high-‘ und ‚low positive‘ gewerteten Fälle in den nodal positiven Fällen und in der Kontrollgruppe. Nodal positive: CD133 ‚low positive‘ (n=162; 84%), CD133 ‚high positive‘ (n=32; 16%), gesamt (n=194). Kontrollgruppe: ‚low positive‘ (n=15), ‚high positive‘ (n=2), gesamt (n=17).

Die Expression von CD133 ergab keinen Unterschied in den beiden Gruppen mit und ohne Kapseldurchbruch. Der Anteil der CD133 ‚high positive‘ Fälle lag in der Gruppe mit extranodalem Wachstum bei 18,6% und in der Gruppe ohne Kapseldurchbruch bei 15,3%. Der Unterschied ist somit vernachlässigbar ($p=0,56$).

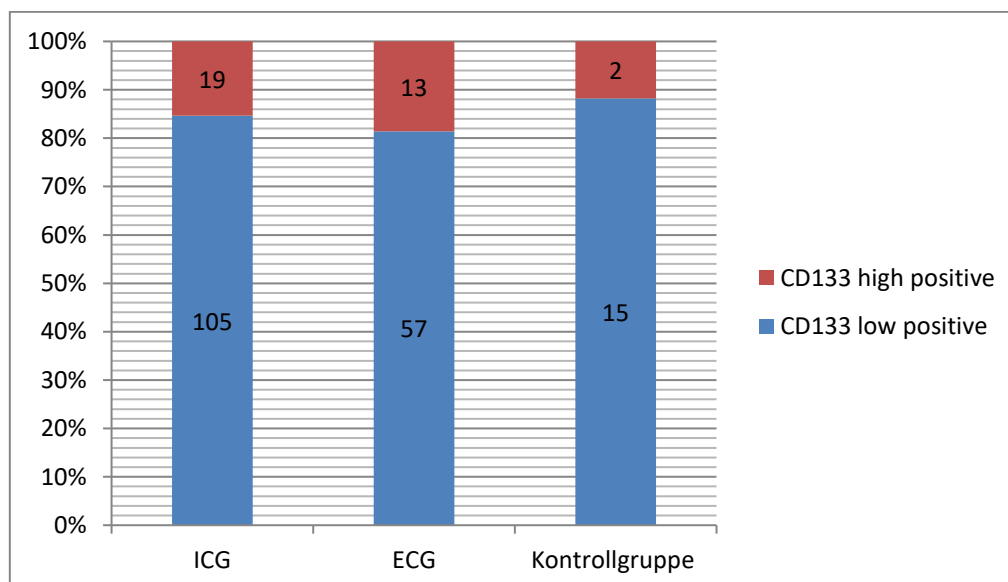


Abb. 63: CD133 Expression in Abhängigkeit vom ECG. ECG= extrakapsuläres Lymphknotenwachstum, ICG= ausschließlich intrakapsuläres LK-Wachstum. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der CD133-Expression in den drei Gruppen.

Die CD133-Expression hat bei dem hier vorliegenden Patientenkollektiv keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben ($p=0,34$).

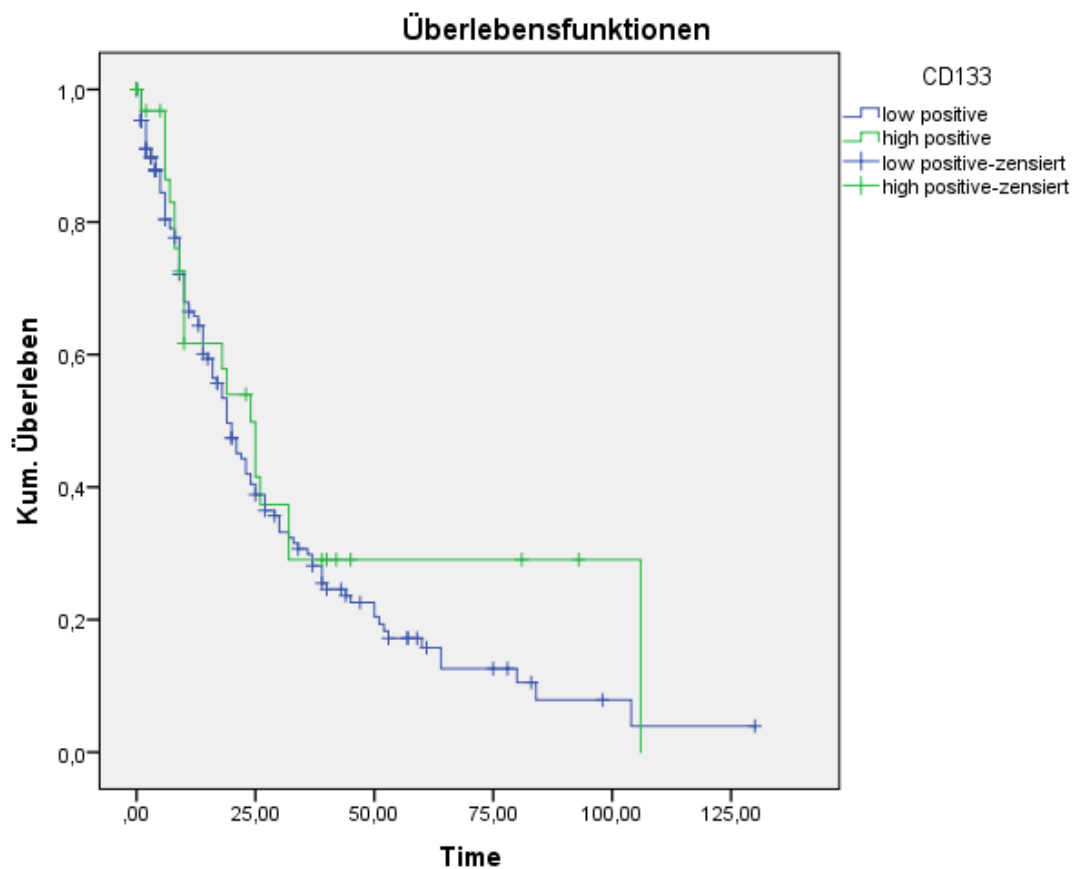


Abb. 64: Magenkarzinom. Kumulatives Überleben in Abhängigkeit der CD133-Expression. CD133 ,low-positive' (n=174; 118 Ereignisse, 56 Zensierungen), CD133 ,high-positive' (n=34; 20 Ereignisse, 14 Zensierungen). Gesamtkollektiv (n=208, 138 Ereignisse, 70 Zensierungen)

e. SOX2

SOX2 war in 62% der nodal positiven Fälle (n=120) negativ. Die Kontrollgruppe wies in 7 von 17 Fällen eine positive SOX2-Expression auf. Die nodal positiven Fälle unterschieden sich somit in der SOX2-Expression nicht signifikant von der Kontrollgruppe (p= 0,81).

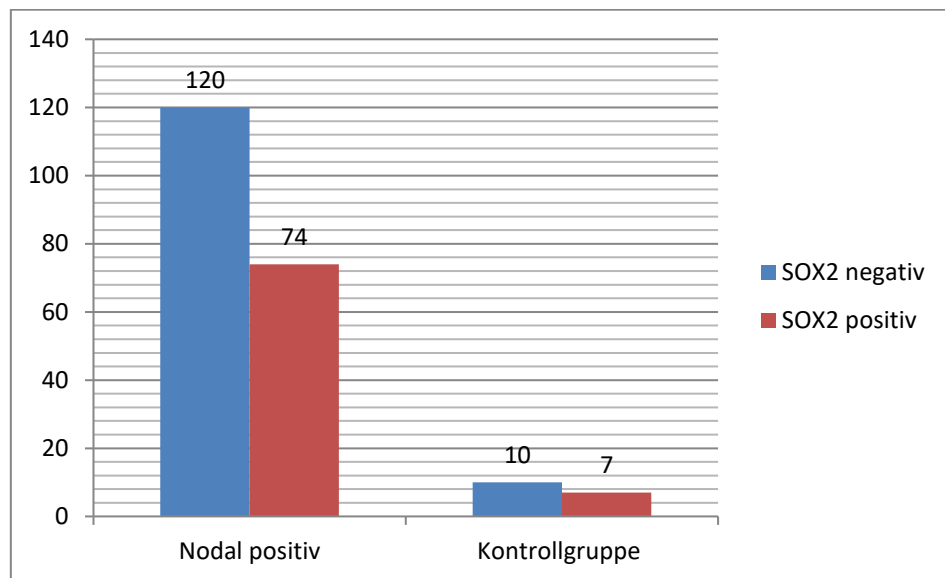


Abb. 65: Verteilung der SOX2 negativen und positiven Fälle. nodal positive Fälle: SOX2 negativ (n=120; 62%), SOX2 positiv (n=74; 38%), gesamt (n=194). Kontrollgruppe (n=17): SOX2 negativ (n=10), SOX2 positiv (n=7).

Es konnte keine signifikante Korrelation der SOX2 Expression mit dem ECG nachgewiesen werden. In der Gruppe mit nachgewiesenem Kapseldurchbruch (ECG) lag der Anteil der SOX2 negativen Fälle bei 59%, in der Gruppe ohne Kapseldurchbruch (ICG) bei 64% (p=0,48).

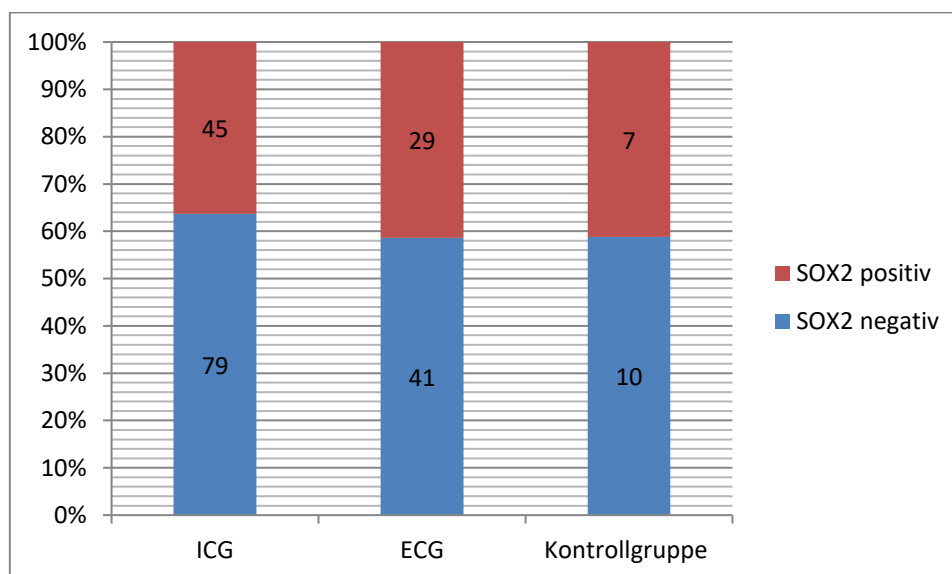


Abb. 66: SOX2 Expression in Abhängigkeit vom ECG. ECG= extrakapsuläres Lymphknotenwachstum, ICG= ausschließlich intrakapsuläres LK-Wachstum. Die Gruppen unterscheiden sich nicht in Bezug auf die SOX2 Expression.

Anhand unseres Patientenkollektivs konnte kein Einfluss der SOX2 Expression auf die Prognose beim Magenkarzinom festgestellt werden ($p=0,76$).

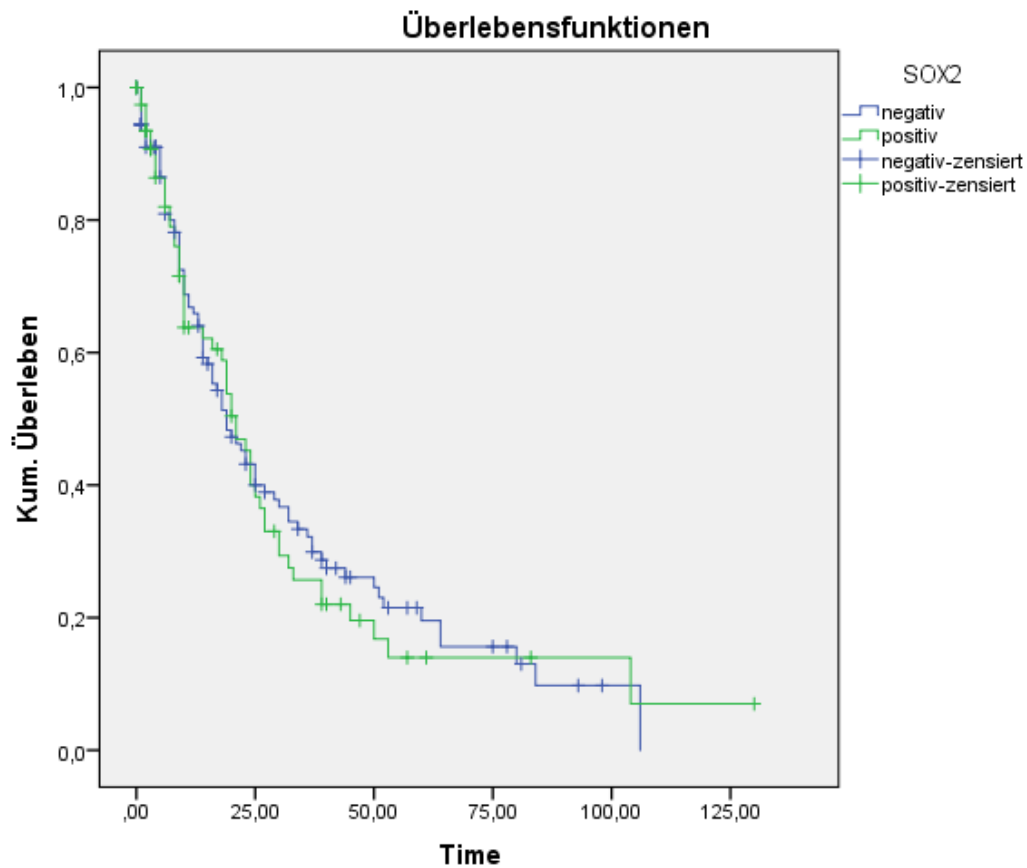


Abb. 67: Magenkarzinom. Kumulatives Überleben nodal positiver Fälle in Abhängigkeit der SOX2-Expression. SOX2 negativ (n=128; 85 Ereignisse, 43 Zensierungen), SOX2 positiv (n=80; 53 Ereignisse, 27 Zensierungen). Gesamtkollektiv (n=208, 138 Ereignisse, 70 Zensierungen).

f. SOX9

Der Großteil der Patienten mit Lymphknotenmetastasen wies eine hohe SOX9-Expression auf (n=165; 86%); bei insgesamt 29 Patienten (15%) wurde eine geringe oder fehlende SOX9 Expression festgestellt. In der Kontrollgruppe wiesen insgesamt zehn Fälle eine hohe und sieben eine geringe SOX9-Expression auf. Die SOX9-Überexpression ist somit in den Fällen mit Lymphknotenmetastasen signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p=0,006$).

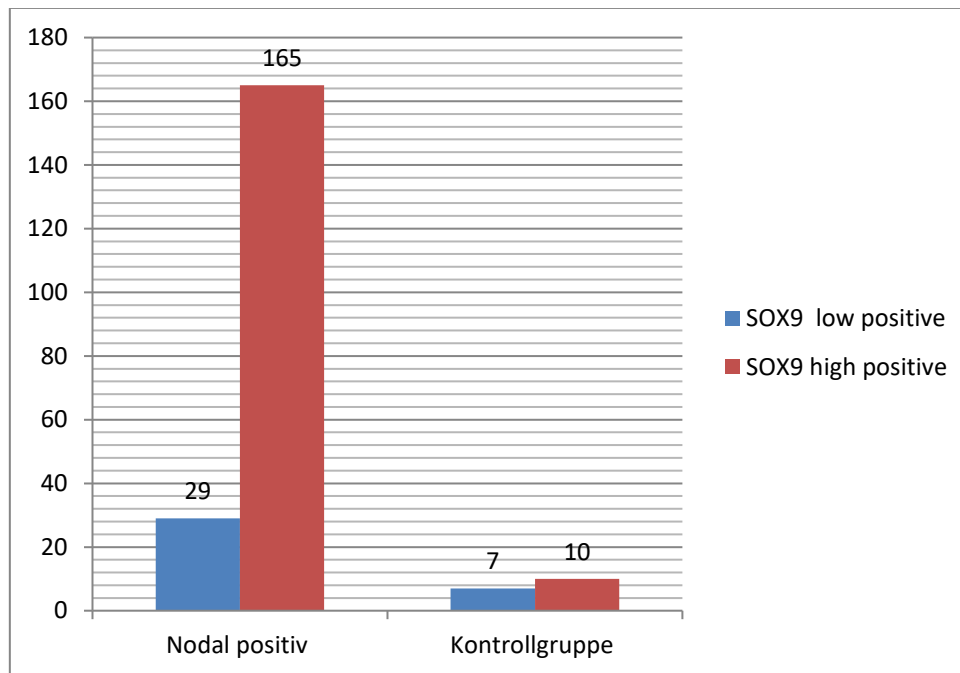


Abb. 68: Verteilung der als SOX9 ‚high-‘ und ‚low positive‘ gewerteten Fälle. Nodal positive Fälle (n=194): SOX9 ‚low positive‘ (n=29; 15%), SOX9 ‚high positive‘ (n=165; 85%). Kontrollgruppe (n=17): ‚low positive‘ (n=7; 41%), ‚high positive‘ (n=10; 59%). Der Anteil der SOX9-Überexpression ist in den nodal positiven Fällen signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p=0,006$).

In der ECG-Gruppe wiesen 96% eine Überexpression von SOX9 auf, in der ICG-Gruppe waren dies nur 79%.

Wir konnten somit nachweisen, dass eine hohe SOX9-Expression auch mit einem häufigeren Auftreten eines Lymphknoten-Kapseldurchbruchs korreliert ($p=0,002$).

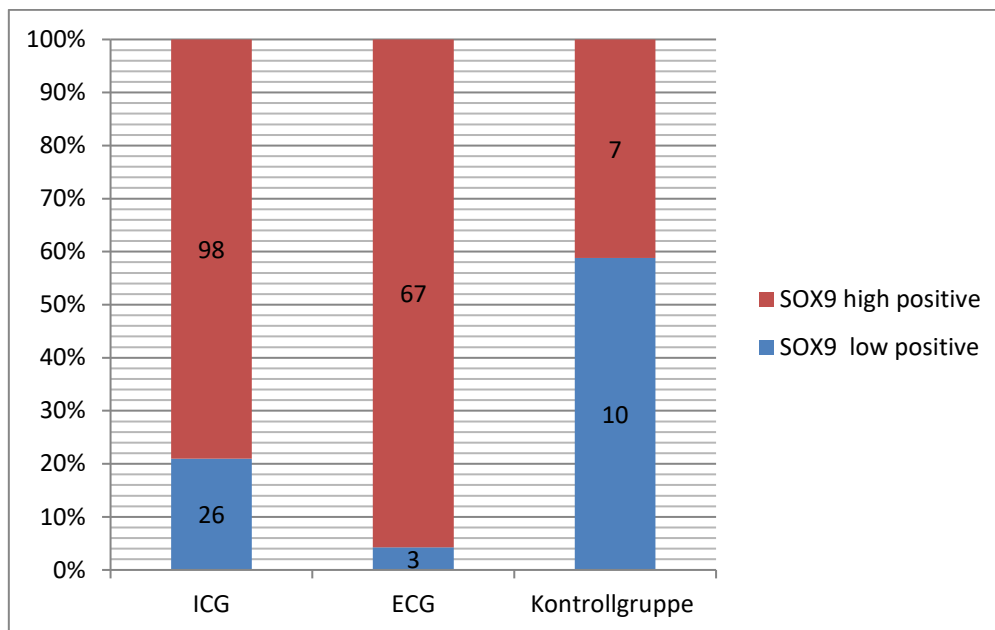


Abb. 69: SOX9 Expression in Abhängigkeit vom ECG. ECG= extrakapsuläres Lymphknotenwachstum, ICG= ausschließlich intrakapsuläres LK-Wachstum. SOX9 ‚low positive‘ (n=29), SOX9 ‚high positive‘ (n=165). ECG (n= 70), ICG (n=124). Gesamtkollektiv (n=194). Die SOX9-Überexpression ist signifikant mit dem Auftreten eines Kapseldurchbruchs assoziiert ($p=0,002$).

Die SOX9-Expression hat bei dem hier vorliegenden Patientenkollektiv keinen Einfluss auf das Überleben ($p=0,81$).

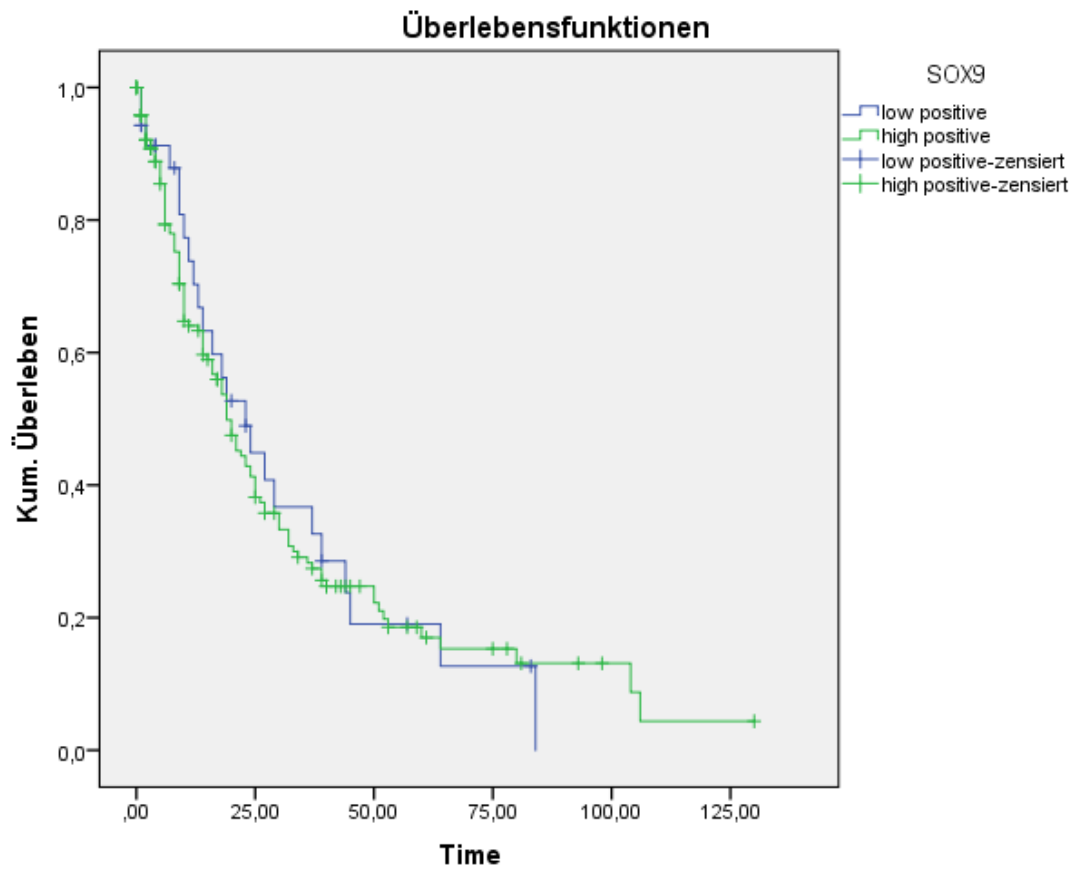


Abb. 70: Magenkarzinom. Kumulatives Überleben nodal positiver Fälle in Abhängigkeit der SOX9-Expression. SOX9 ,low-positive' (n=35; 24 Ereignisse, 11 Zensierungen), SOX9 ,high-positive' (n=173; 114 Ereignisse, 59 Zensierungen). Gesamtkollektiv (n=208, 138 Ereignisse, 70 Zensierungen)

5 Diskussion

5.1 Repräsentativität des Kollektivs

Die Inzidenz des Magenkarzinoms hat in den letzten Jahren stetig abgenommen [4], was unter anderem auf die Konservierung und Kühlung von Lebensmitteln, aber auch auf die veränderten Ernährungsgewohnheiten sowie die Etablierung der Eradikation des Bakteriums *Helicobacter pylori* zurückzuführen ist [4].

Auch der Anteil der Magenkrebsmortalität an der gesamten tumorabhängigen Mortalität ist von 20,7% im Jahr 1968 auf aktuell 6,7% gesunken [4]. Der Rückgang der Mortalität hängt vor allem mit der vermehrten Durchführung von Gastroskopien zusammen, welche dazu geführt hat, dass Magenkarzinome bereits in frühen, asymptomatischen Stadien entdeckt werden (in den letzten 20 Jahren sind Tumore im Stadium IV um fast 20% zurückgegangen, die in Stadium I haben hingegen zugenommen)[4].

Mit fortschreitendem T-Stadium, welches der Infiltrationstiefe des Primärtumors entspricht, steigt auch der Anteil der Patienten mit Lymphknoten- und Fernmetastasen. Infiltriert der Primärtumor die Serosa (pT3), haben bereits 54% der Patienten bis zu 15 tumorinfiltrierte Lymphknoten (pN2), 36% weisen Fernmetastasen auf (M1) [4].

Die Überlebenszeit ab Diagnosestellung verkürzt sich mit zunehmendem Tumorstadium. Der Median in Stadium UICC I beträgt 22 Monate, in Stadium IV nur noch 5,4 Monate. Die Stadienverteilung nach UICC stellt somit eine prognostische Gruppierung dar [4]. Auch im Rahmen der hier vorliegenden Studie konnte dieser Einfluss des Tumorstadiums auf die Prognose nachvollzogen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass das Patientenkollektiv dieser Studie repräsentativ ist und daher auch andere Ergebnisse auf die Gesamtpopulation übertragen werden können. Die Gruppengröße von 196 Patienten reicht aus, um ein zuverlässiges Ergebnis darstellen zu können. Grundsätzlich ist durch das Setting dieser Studie das Problem gegeben, dass alle Patienten Lymphknotenmetastasen aufweisen. Somit fehlt eine N0- bzw. UICC I-Vergleichsgruppe. Die Darstellungen des Überlebens in Abhängigkeit vom T- und UICC- Stadium werden verzerrt. Obwohl die UICC-Einteilung den Vorteil bietet, die ‚Bias‘, welche durch die Vorauswahl von ausschließlich nodal positiven Fällen entstanden ist, größtenteils zu kompensieren, sind auch diese Überlebensdaten schlechter als die allgemein bekannten. Eine Ausnahme stellt hier das UICC Stadium IV dar, da es sich in dieser Gruppe ohnehin um ausschließlich metastasierte Fälle handelt.

Trotzdem zeigen die Ergebnisse, dass etablierte Prognosefaktoren beim Magenkarzinom auch auf dieses Kollektiv anwendbar sind und es somit ein gutes Korrelat für das Gesamtkollektiv der Magenkrebspatienten darstellt. Das Überleben korreliert mit dem T-, N- und UICC-Stadium.

Die Kaplan-Meier-Statistik in Abhängigkeit vom N-Stadium ergab einen statistisch hoch signifikanten Unterschied des kumulativen Überlebens der Gruppen N1, N2 und N3 ($p < 0,0001$). Das Tumorregister München gibt für nodal positive Fälle ein medianes Überleben von 24 Monaten an [4], unser Ergebnis für das mediane Überleben der nodal positiven Fälle liegt bei 19 Monaten und liefert somit einen vergleichbaren Wert.

Auch in Abhängigkeit des T-Stadiums konnte ein signifikanter Überlebensunterschied ($p = 0,03$) nachgewiesen werden. Das Tumorregister München gibt folgende Überlebensmediane an: T2 - über 6 Jahre, T3 - 24 Monate, T4 - 18 Monate [4]. Die Daten dieser Studie weisen erwartungsgemäß ein schlechteres medianes Überleben für alle drei Gruppen auf: T2-23 Monate, T3-18 Monate und T4-10 Monate. Der prognostische Einfluss des T-Stadiums ist trotz des einseitigen Patientenkollektivs zu erkennen.

Eine geeignetere Alternative, um den prognostischen Einfluss des Tumorstadiums für diese Studie nachzuvollziehen, bietet die UICC-Einteilung.

Wie bereits oben aufgeführt, stellt diese eine prognostische Gruppierung dar [4]. Der Einfluss eines fortgeschrittenen UICC-Stadiums auf das Überleben ist auch im Rahmen dieser Studie nachvollziehbar ($p < 0,0001$). Das mediane Überleben ist auch hier – mit Ausnahme des Stadiums IV - verglichen mit bekannten Daten aus der Literatur tendenziell kürzer. Das Tumorregister München gibt ein medianes Überleben von 36 Monaten und 19 Monaten für die Stadien II und IIIA an[4]; unsere Daten liegen für Stadium II bei 32 Monaten, für Stadium III bei 14 Monaten. Das Stadium IV ergab in dieser Studie ein medianes Überleben von 11 Monaten, es ist somit sogar länger als der vom Tumorregister München veröffentlichte Wert von 7 Monaten [4]. Dies bestätigt die Annahme, dass die Daten der restlichen Stadien ebenfalls durch die Auswahl ausschließlich nodal positiver Fälle verkürzt werden. Zusätzlich ist die Angabe von 19 Monaten des Tumorregisters München ausschließlich auf die Untergruppe IIIA bezogen, wohingegen unsere Daten auf das gesamte Stadium III berechnet sind.

5.2 Extrakapsuläres Wachstum- ein wichtiger Parameter für das Magenkarzinom

Extranodales Wachstum wird in onkologischen Studien bereits seit einiger Zeit untersucht [70-72].

ECG ist sowohl beim Magenkarzinom als auch bei anderen Karzinomen des Gastrointestinal-Traktes mit einer schlechten Prognose assoziiert [11] und gewinnt daher auch in Studien über Tumore des GI-Traktes zunehmend an Bedeutung. Für das Ösophaguskarzinom ist die Gesamtmortalität mit einer HR von 2,72 ($p < 0,0001$) bei Patienten mit ECG deutlich erhöht [73]; ähnliche Ergebnisse liegen auch für das Kolonkarzinom vor, wo die Gesamtmortalität von Patienten mit extranodalem Wachstum um den Faktor 1,7 ($p < 0,0001$) erhöht ist [10]. Für das Magenkarzinom konnte der prognostische Wert des extrakapsulären Wachstums ebenfalls nachvollzogen werden; die 5-Jahres-Überlebensrate ist bei Patienten mit ECG signifikant schlechter als bei Patienten ohne ECG; in der multivariaten Analyse ist ECG ein unabhängiger Prognosefaktor [9, 74]. Ein prognostischer Unterschied wurde für das Magenkarzinom auch für die Subgruppe der T1-klassifizierten Patienten in Abhängigkeit des ECG nachgewiesen [9].

ECG korreliert neben einer schlechten Prognose auch mit histomorphologischen Parametern wie der TNM-Kategorie, Lymphgefäßinvasion und dem Tumor Grading. Für das Magenkarzinom wurde eine Assoziation von ECG mit fortgeschrittenem T- und N-Stadium sowie mit einer Lymphgefäßinvasion beobachtet [9]. Auch beim Kolonkarzinom konnte eine Assoziation von ECG mit fortgeschrittenem T-Stadium und höherem Grading nachgewiesen werden [10].

Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen somit weitestgehend bereits publizierte Daten anderer Arbeitsgruppen.

Es konnte ein schlechteres Gesamtüberleben der Patienten mit extranodalem Wachstum nachgewiesen werden; das mediane Überleben lag bei den Fällen mit ECG bei 10 Monaten, bei den Fällen ohne Kapseldurchbruch bei 27 Monaten ($p < 0,0001$). Die multivariate Analyse ergab, dass der Faktor ‚ECG‘ ein unabhängiger Prognosefaktor ist (HR= 2,1; 95% KI 1,4-3,1; $p = 0,001$).

Um die zu vergleichenden Gruppen möglichst homogen zu gestalten, wurde anschließend eine Subgruppenanalyse durchgeführt, bei der die Stadien II und III getrennt voneinander nach dem Überleben in Abhängigkeit des Faktors ECG untersucht wurden.

Vergleicht man die Fälle des Stadiums II, so kann auch hier ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben nachgewiesen werden (HR= 2,9; 95% KI 1,5-5,6; $p = 0,001$).

Für die Fälle des UICC Stadiums III konnte ein solches Ergebnis zwar nicht nachvollzogen werden (HR= 1,2; 95% KI 0,6-2,4; p=0,62), dem sollte aber aufgrund der geringen Gruppengröße von 47 Fällen nicht allzu viel Gewichtung gegeben werden. Somit konnte der Einfluss des extranodalen Wachstums auf das Überleben für das Gesamtkollektiv und die Fälle des Stadiums II auch anhand des hier vorliegenden Patientenkollektivs nachvollzogen werden.

Auch die Assoziation des ECG mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, dem Vorhandensein einer Lymphangiose und dem Grading konnte bestätigt werden. Mit zunehmendem T-Stadium steigt auch der Anteil der Fälle mit extrakapsulärem Wachstum. Der Anteil des ECG lag in Stadium T2 bei knapp 28% (n=97), in Stadium T4 bereits bei 56% (n=34; p=0,03). Diese Ergebnisse liefern vergleichbare Werte zu den Angaben der Literatur. Die Autoren Lee et al veröffentlichten im September 2014 eine Studie im ‚British Journal of Surgery‘ über die prognostische Bedeutung des extranodalen Wachstums beim Magenkarzinom. Sie untersuchten insgesamt 1143 Patienten, 483 davon mit ECG und 660 ohne. Hier lag der Anteil des ECG im Stadium T2 bei 24% und im Stadium T4 bei 57% [9]. Auch für das N-Stadium weist die Studie eine vergleichbare Assoziation auf; so lag der Anteil des extrakapsulären Wachstums im Stadium N1 bei 17,7%, im Stadium N2 bei 38,5% und im Stadium N3 bei 68,5% [9]. Vergleichbare Werte konnten auch in unserer Studie erzielt werden: In Stadium N1 lag der Anteil der Fälle mit ECG bei 19% (n=89), in Stadium N2 bei 41% (n=59) und in Stadium N3 bei 63% (n=51; p<0,0001). Neben dem fortgeschrittenen Tumorstadium spielt auch die Invasion von Lymphgefäßen eine Rolle für das Auftreten eines Kapseldurchbruchs. Wurde keine Lymphgefäßinvasion beobachtet, so lag der Anteil des ECG bei 23% (n=56). Unter den Fällen mit Lymphangiosis carcinomatosa wiesen 42% (n=143) ein extrakapsuläres Wachstum auf (p=0,014). Vergleichbare Werte finden sich in der Literatur: L1-48% ECG, L0-32% ECG [9].

Mit zunehmendem Tumorgrad steigt auch der Anteil der Fälle mit extranodalem Wachstum. 31 Patienten wurden als G2 klassifiziert, davon wiesen sieben ein kapselüberschreitendes Wachstum auf (22,6%). Bei den 162 G3-Fällen lag der Anteil des ECG bei 39%. Dieser Unterschied ist zwar nicht signifikant (p=0,2), zeigt aber trotzdem die aus der Literatur bekannte Assoziation von höherem Tumorgrad und vermehrtem ECG. Eine Assoziation von hohem Grading mit vermehrten ECG konnten die Autoren Veronese et al auch für das Kolonkarzinom bestätigen [10].

Extrakapsuläres Wachstum tritt außerdem auch vermehrt bei schlecht zu resezierenden Tumoren auf; es korreliert also mit einem höheren R-Stadium. 118 Patienten wurden R0 reseziert, davon wiesen 31% einen Kapseldurchbruch auf. Bei den 35 R1-resezierten Fällen lag der Anteil des ECG bei 54%. (p=0,047).

In Form des Regressionsgrad nach Becker wurden die Gruppen ECG und ICG außerdem auf einen Unterschied in ihrem Ansprechen auf eine vorangegangene Chemotherapie untersucht. 59 der 199 nodal positiven Fälle wurden vorthorapiert, von 58 Fällen konnte der Regressionsgrad n. Becker vollständig eruiert werden. Es ergab sich kein Unterschied im Ansprechen auf die Chemotherapie zwischen den Gruppen ECG und ICG (p=0,42).

Diese Assoziationen eines ECG mit fortgeschrittenem Tumorstadium und schlechter Prognose implizieren, dass extrakapsuläres Wachstum ein morphologischer Marker für einen aggressiveren biologischen Phänotyp der gastrointestinalen Tumore darstellt. In dieser Studie konnte jedoch kein Zusammenhang von ECG zur Klassifikation nach Lauren nachgewiesen werden (intestinaler Typ 31% ECG vs. diffuser Typ 48% ECG vs. Mischtyp 32% ECG; p=0,059) was im Einklang mit bereits publizierten Daten steht[9]. Obwohl die als diffus klassifizierten Karzinome dafür bekannt sind, aggressiver zu wachsen und daher eine schlechtere Prognose aufweisen [75], scheint extrakapsuläres Wachstum in diesen Tumoren nicht vermehrt aufzutreten. Es ist daher denkbar, dass ECG vielmehr mit intrinsischen Faktoren wie der Stammzelligkeit von Tumorzellen assoziiert ist.

5.3 Extrakapsuläres Wachstum und Biomarker

Es stellt sich aufgrund der bekannten Assoziation von extrakapsulärem Wachstum mit fortgeschrittenem Stadium und schlechterer Prognose die Frage, ob die Einteilung der Karzinome nach dem Vorhandensein eines Kapseldurchbruchs auch tumorbiologisch nachvollziehbar ist. Die bisherigen Ergebnisse sprechen für ein aggressiveres Wachstumsmuster der Karzinome mit ECG. Um diese aggressive Subpopulation auf tumorbiologischer Ebene besser zu verstehen, wurde die Expression verschiedener Biomarker untersucht und in den Gruppen ‚ECG‘ und ‚ICG‘ verglichen. Die Auswahl der Marker wurde bereits in der Einleitung näher erläutert. Die Marker sind dafür bekannt, ein aggressives Tumorwachstum zu identifizieren und eignen sich daher gut für die Fragestellung dieser Studie.

Die Expression der von uns untersuchten Marker wurde mittels Immunhistochemie anhand der Paraffinblöcke der Primärtumore dargestellt und anschließend auf einen Unterschied in den Gruppen ECG vs. ICG untersucht. Um einen Vergleich mit bereits bekannten Ergebnissen herstellen zu können und um auch für die Färbungen im Rahmen dieser Studie eine Kontrollgruppe zu haben, wurde die Immunhistochemie zusätzlich an 17 Fällen mit dem T-Stadium 3 oder 4 und ohne Lymphknoten- und Fernmetastasen (N0M0) durchgeführt. Diese Gruppe zeichnet sich durch ein vergleichsweise wenig aggressives Wachstumsmuster aus, da trotz stark infiltrierender und großer Primärtumore keine Neigung zu metastasierendem Wachstum besteht. Somit stellen sie gewissermaßen ein Konträr zu den aggressiv wachsenden Karzinomen mit Nachweis eines kapselüberschreitenden Wachstums dar.

Für die Marker MLH1, β -Catenin, CD133 und SOX2 konnte kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den Gruppen mit und ohne extranodalem Wachstum festgestellt werden. Auch in der Kontrollgruppe unterschied sich das Expressionsmuster nicht von den Fällen mit Lymphknotenmetastasen.

Für MSH2 konnte kein Vergleich angestellt werden, da alle untersuchten Fälle eine vorhandene MSH2-Expression aufwiesen. Wie bereits beschrieben, ist ein Verlust der MSH2-Expression hauptsächlich mit hereditären Formen des Magenkarzinoms vergesellschaftet. Da diese Tumore weniger häufig Fernmetastasen aufweisen, war das Ergebnis nicht überraschend, da die Studie fast ausschließlich Fälle mit Lymphknotenmetastasen umfasst.

Die SOX9-Expression unterschied sich signifikant in den Gruppen mit und ohne ECG sowie in der Kontrollgruppe. Der Anteil der SOX9-überexprimierenden Fälle war in der ECG-Gruppe signifikant höher als in der ICG-Gruppe ($p=0,002$). Auch in den gesamten Fällen mit Lymphknotenmetastasen war die Expression signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p=0,006$). So wiesen in der Gruppe mit extranodalem Wachstum ($n=70$) insgesamt 96% der Fälle eine Überexpression von SOX9 auf, in der Gruppe mit ausschließlich intrakapsulärem Lymphknotenbefall ($n=124$) waren es nur 79%. Die Fälle mit Lymphknotenmetastasen ($n=194$) weisen somit zu 85% eine gesteigerte SOX9-Expression auf. In der Kontrollgruppe von 17 Fällen konnte bei 10 Fällen eine Überexpression nachgewiesen werden (59% (10/17)). Somit korreliert eine erhöhte SOX9-Expression sowohl mit dem vermehrten Auftreten von metastasierendem Wachstum als auch mit einem erhöhten Anteil von kapselüberschreitendem Wachstum.

Die Ergebnisse der Studie liegen insgesamt etwas höher als bereits veröffentlichte Zahlen. In der 2011 erschienenen Studie der Autoren Zhou et al wurden insgesamt 186 Patienten mit Magenkarzinom auf die SOX9 Expression untersucht. Der Anteil der nodal positiven Fälle mit mehr als 33% SOX9-exprimierenden Tumorzellen lag hier bei insgesamt 72% [69].

5.4 Limitationen der Studie

Da auf bereits archivierte und dokumentierte Daten zurückgegriffen wurde, handelt es sich um eine retrospektiv angelegte Studie. Der Umfang war mit einem Gesamtkollektiv von 216 Patienten begrenzt. Auch wenn die Anzahl der nodal positiven Fälle mit insgesamt 199 Patienten aussagekräftig ist, mangelte es vor allem an Kontrollfällen. Die Zahl der Kontrollen wurde weiter durch Mangel an allen Paraffinblöcken von 27 auf 17 Fälle reduziert.

Die beschriebenen Assoziationen von SOX9 mit fortgeschrittener TNM-Kategorie und schlechter Prognose sowohl beim Magenkarzinom als auch bei anderen gastrointestinalen Tumoren [31, 67-69] konnte in dieser Studie nicht nachvollzogen werden, weil es sich bei den vorliegenden Fällen fast ausschließlich um nodal positive Tumore handelt und die Daten daher unausgewogen und nicht repräsentativ sind. Aus demselben Grund konnte auch für die anderen Marker kein signifikanter Unterschied im Überleben festgestellt werden, obwohl publizierte Daten einen Einfluss der Expression von MLH1, CD133, β -Catenin und SOX2 auf die Prognose versichern [18, 76-79].

5.5 Klinische Relevanz

ECG wurde bereits in Tumorklassifikations-Systeme von Kopf- und Halstumoren aufgenommen [80] und sollte neben den etablierten Tumorklassifikationen nach TNM und UICC auch Eingang in die Klassifikation von gastrointestinalen Tumoren finden, zumal ECG für das Magenkarzinom einen unabhängigen Prognosefaktor darstellt.

Die vermehrte SOX9-Expression bei Patienten mit nachgewiesenem extrakapsulärem Wachstum bietet einen vielversprechenden Ansatzpunkt für eine gezielte Therapie dieser aggressiven Subgruppe. Betrachtet man zusätzlich die höhere Expression von SOX9 bei den nodal positiven Fällen im Vergleich zur Kontrollgruppe und publizierte Daten über den Einfluss von SOX9 auf das Tumorstadium und die Prognose [31, 67-69], unterstützt dies die Theorie, dass eine Alteration des Transkriptionsfaktors SOX9 einen Einfluss auf die Aggressivität des Magenkarzinoms hat. Es stellt somit ein mögliches Target für eine zielgerichtete Therapie dar, auch wenn SOX9 in dieser Studie keinen Einfluss auf die Prognose hat.

Es lässt sich von der beschriebenen Assoziation ableiten, dass ECG ein vielversprechender morphologischer Marker für einen aggressiveren Phänotyp darstellt und sich die Tumore mit extrakapsulärem Wachstum in ihrer Tumorbilogie unterscheiden. Es sollte daher weiter erforscht werden, welche Alterationen bei Karzinomen mit ECG vorherrschend sind, um die Tumorbilogie dieser Subgruppe besser verstehen zu können und diese zukünftig gezielt therapieren und dadurch die Prognose verbessern zu können.

6 Ausblick – Therapie des Magenkarzinoms in Gegenwart und Zukunft

6.1 Überblick über die aktuelle leitliniengerechte Therapie der primär resektablen Magenkarzinome

Laut AWMF stellt die chirurgische Resektion aktuell die einzige kurative Behandlung und damit die Standardtherapie für alle potentiell resektablen Magenkarzinome dar[5]. Die endgültige Therapie wird dabei beeinflusst vom UICC-Stadium, der Tumorlokalisation und der Lauren-Klassifikation.

Unterschieden wird aktuell nach dem UICC- Stadium zwischen lokalen und fortgeschrittenen Tumoren. Zu letzteren werden Karzinome ab einer T3-Kategorie oder lymphknotenmetastasierte (N+) Tumore gezählt. Für diese Karzinome hat sich ein multimodales Therapiekonzept bewährt, welche eine Kombination von chirurgischer Resektion mit perioperativer Chemotherapie vorsieht [5].

Während das UICC-Stadium Einfluss auf die Wahl eines multimodalen Therapiekonzepts hat, spielen die Lauren-Klassifikation und die Tumorlokalisation eine Rolle für den Sicherheitsabstand und das Ausmaß der chirurgischen Resektion:

Da bei diffusen Karzinomen gelegentlich eine diskontinuierliche Ausbreitung in der Magenwand nach proximal auftritt, wird hier standardmäßig ein proximaler Sicherheitsabstand von 8 cm eingehalten. Der intestinale Typ weist eine solche Ausbreitung nicht auf; hier reicht in der Standardtherapie ein proximaler Sicherheitsabstand von 5 cm aus, um möglichst tumorfreie Resektionsränder zu erzielen [81, 82].

Die Tumorlokalisation beeinflusst zusätzlich das Ausmaß der Gastrektomie. Bei Patienten mit diffusen Karzinomen des oberen und mittleren Magendrittels führt der einzuhaltende Resektionsrand immer zu einer totalen Gastrektomie. Eine subtotale distale Magenresektion kommt für diffuse Karzinome lediglich bei Lokalisation im unteren Magendrittel in Frage. Bei intestinalen Karzinomen hingegen stellt die subtotale distale Gastrektomie sowohl bei Karzinomen im unteren als auch im mittleren Magendrittel eine Option dar. Bei proximalen Magenkarzinomen und AEG Tumoren vom Typ II und III muss unabhängig von der Lauren-Klassifikation eine erweiterte Gastrektomie mit distaler Ösophagusresektion erfolgen[83].

Das Ziel der chirurgischen Resektion ist eine totale Entfernung sowohl des Karzinoms als auch der regionären Lymphknoten. Hier wird standardgemäß eine D2 Lymphadenektomie durchgeführt, in der Regel umfasst dies mindestens 25 regionäre Lymphknoten von Kompartiment I und II (zur Erläuterung siehe Abbildung 71). Für eine zuverlässige Beurteilung des pN Status sind mindestens 16 Lymphknoten erforderlich. Die D2 Lymphadenektomie bietet einen Prognosevorteil im Vergleich zur D1 LAD. Bei verdächtigen Lymphknoten im Milzhilus wird außerdem eine Splenektomie unter Pankreaserhalt empfohlen [5].

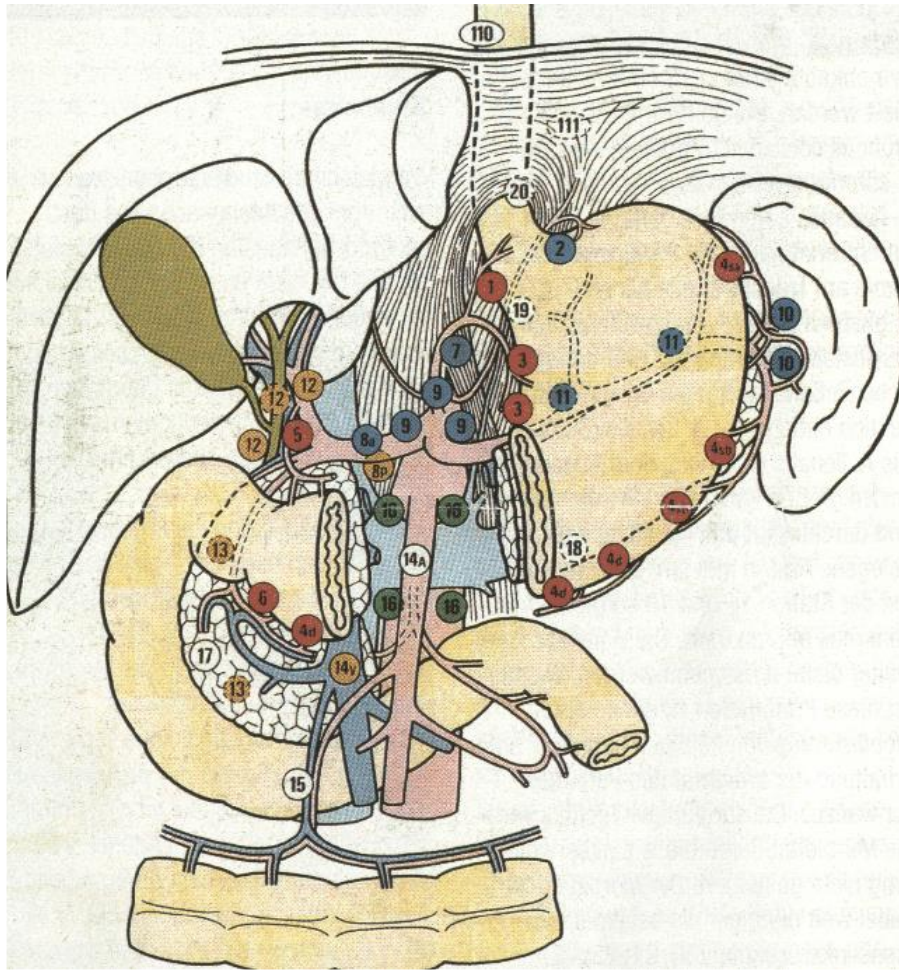


Abb. 71 [5]: Eine D2 Lymphadenektomie umfasst die Lymphknoten aus Kompartiment I (D1, LK Stationen 1-6) sowie die Lymphknoten aus Kompartiment II (LK Stationen 7-11) [5].

6.2 Perioperative Therapieschemata

Zu große und daher primär nicht resektable Karzinome können durch präoperative Therapiekonzepte verkleinert und somit operabel gemacht werden. Aber auch bei kleineren Tumoren ab Stadium uT2 kann ein perioperatives Schema in Erwägung gezogen werden [1].

Der Vorteil einer neoadjuvanten gegenüber einer adjuvanten Therapie ist neben der Tumorverkleinerung eine bessere Compliance der Patienten und die Möglichkeit der frühen Bekämpfung von einzelnen, bereits verbreiteten Tumorzellen. Da bei fast 60% der Patienten ein Rezidiv nicht lokal im Bereich des Primärtumors, sondern in Form von Fernmetastasen auftritt, ist eine frühe systemische Therapie sinnvoll. Deshalb wird standardmäßig ab dem Stadium uT2 oder uT3 eine perioperative Chemotherapie durchgeführt [1]. Eine relevante prognostische Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate (36% vs. 23%, $p=0,009$) durch perioperative Chemotherapie konnte unter anderem in der MAGIC-Studie nachgewiesen werden [84]. Sie stellt daher aktuell die leitliniengerechte Therapie dar. Vorrangig werden das ECF-Schema oder 5FU/Platin-Kombinationen verwendet.

Eine präoperativ begonnene Chemotherapie soll – nach sonographischem Ausschluss einer Fernmetastasierung- adjuvant weitergeführt werden [1].

Eine ausschließlich adjuvante Chemotherapie ohne neoadjuvanter Vorbehandlung wird derzeit nur im Rahmen klinischer Studien empfohlen.

Auch die kombiniert oder alleinig angewandte Radiotherapie wird derzeit aufgrund fehlender Datenlage sowohl prä- als auch postoperativ nur in Studien oder in Einzelfällen angewendet [1].

6.3 Therapieindividualisierung

Unter den oben aufgeführten Erläuterungen zur aktuellen Therapie des Magenkarzinoms geht hervor, dass das Therapieausmaß ausschließlich nach dem TNM-Stadium und der Lauren-Klassifikation entschieden wird. Die Patienten werden lediglich nach Gruppen in lokal vs. fortgeschritten, diffus vs. intestinal und nach der Tumorlokalisation im Magen eingeteilt und anschließend kategorisiert therapiert.

Um die Prognose des Magenkarzinoms weiter verbessern zu können, fordert es eine individualisierte Therapie im Rahmen einer personalisierten Medizin. Voraussetzung dafür sind Biomarker, deren Expressionsmuster mit der Aggressivität und Prognose des Tumors korreliert.

Ein bereits etablierter Marker ist der HER-2 Status, welcher aktuell für die palliative Therapie des Magenkarzinoms eine Konsequenz hat. Unterschieden wird leitliniengerecht nach Karzinomen mit und ohne HER-2 Überexpression.

Die palliative Therapie für Magenkarzinome ohne HER-2 Überexpression sieht eine systemische Kombinationstherapie von Platin- und Fluoropyrimidin-haltigen Chemotherapeutika vor, vorzugsweise werden Cisplatin und 5-FU verwendet. Für HER-2 überexprimierende Tumore wird zusätzlich zu der vorgesehenen Zweifachkombination aus Cisplatin und 5-FU der Einsatz des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab empfohlen [5].

Mit dem Ziel, eine individuelle Therapie zukünftig auch im kurativen Bereich durchsetzen zu können, muss weiter intensiv nach tumorbiologischen Unterschieden der Karzinome gesucht werden, um diese als Targets nutzen zu können. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie beweisen, dass der Parameter ‚ECG‘ einen möglichen Ansatzpunkt zur Differenzierung der tumorbiologischen Subgruppen des Magenkarzinoms darstellt. Es stellt somit einen vielversprechenden Ansatzpunkt in der Tumorforschung dar.

7 Zusammenfassung

Hintergrund:

Obwohl die Inzidenz in den letzten Jahren zurückgegangen ist, stellt das Magenkarzinom weltweit die dritthäufigste tumorassoziierte Todesursache dar. Die Prognose verschlechtert sich mit fortschreitendem Tumorstadium drastisch. Die TNM-Einteilung basierend auf Tumorgroße, Lymphknotenbefall und Fernmetastasierung dient zur Risikostratifizierung; die UICC-Stadien stellen darauf basierend eine prognostische Differenzierung dar. Neben dieser etablierten Einteilung konnte für die nodal positiven Patienten eine weitere Stratifizierung anhand des Wachstumsmusters der Lymphknotenmetastasen aufgezeigt werden. Der Parameter des extrakapsulären Lymphknotenbefalls, kurz ECG, beschreibt die Ausdehnung der nodalen Metastase über die vorhandene Lymphknotenkapsel hinaus. Karzinome, die ein solches Phänomen nicht aufweisen, werden nachgehend als ICG bezeichnet. Es gibt bereits Anhaltspunkte für eine Assoziation des Parameters ‚ECG‘ mit schlechterer 5-JÜR sowie fortgeschrittenem T- und N-Stadium. Es stellt sich die Frage, ob das extrakapsuläre Wachstum ein Indiz für eine aggressivere Tumorbiologie ist. Um dies zu untersuchen, wurden die Gruppen ECG und ICG auf einen Unterschied in der Expression der mit Stammzell-Eigenschaften von Tumorzellen assoziierten Marker (β -Catenin, CD133, SOX2 und SOX9) und Parameter der Mikrosatelliteninstabilität (MLH1, MSH2) analysiert. Für diese Parameter konnte sowohl für das Magenkarzinom als auch für das Kolonkarzinom eine prognostische Relevanz aufgezeigt werden.

Methoden:

Basis der Studie war die prospektiv-klinische Magenkarzinom-Datenbank der Chirurgischen Klinik der LMU mit insgesamt 529 Patienten, die im Zeitraum 2002 bis 2014 wegen eines Magenkarzinoms oder AEG-Tumors im Klinikum Großhadern einer onkologischen Resektion unterzogen wurden. Es konnten 260 nodal positive Patienten identifiziert werden; in die Studie eingeschlossen wurden davon letztlich 199 Patienten. Histomorphologisch zeigt sich bei 73 der 199 Patienten (36,7%) ein extrakapsuläres Wachstumsmuster.

Die Expression der mit Stammzell-Eigenschaften von Tumorzellen assoziierten Marker und der Parameter der Mikrosatelliteninstabilität wurde mittels Immunhistochemie untersucht. Als Material dienten die in Paraffin eingebetteten Primärtumoren bzw. Lymphknotenmetastasen. Die Färbungen wurden an 194 der 199 nodal positiven Fälle durchgeführt; lokal fortgeschrittene Karzinome (T3/T4) ohne Nachweis einer Metastasierung (N0 M0) dienten als Modell für ein wenig aggressives Tumorstadium (N=27). Die oben genannten Parameter wurden bei 17 dieser 27 Patienten bestimmt.

Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm SPSS Version 23.0 durchgeführt.

Ergebnisse:

Patienten mit extrakapsulärem Wachstum wiesen ein signifikant geringeres Gesamtüberleben auf als Patienten mit ausschließlich intrakapsulären LK-Metastasen ($p < 0,0001$). In der multivariaten Analyse blieb ECG ein unabhängiger Prognosefaktor für das Magenkarzinom (HR=2,1; 95% KI 1,7-3,4; $p = 0,001$).

Es konnte eine Assoziation von ECG mit dem T- ($p = 0,03$) und N-Stadium ($p < 0,0001$) festgestellt werden. Auch das Vorhandensein einer Lymphangiosis carcinomatosa war mit vermehrtem Kapseldurchbruch assoziiert ($p = 0,014$). Bei den restlichen histomorphologischen Parametern

wie dem Vorhandensein von Fernmetastasen, dem Tumorgrading und dem Ansprechen auf Chemotherapie konnte keine signifikante Assoziation zum ECG festgestellt werden. Die SOX9 Expression war in der ECG Gruppe signifikant höher als in der ICG Gruppe (ECG: 96% high positive; ICG: 79% high positive; $p=0,002$) und in der Kontrollgruppe niedriger als in den nodal positiven Fällen (nodal positiv: 85% high positive; Kontrollgruppe: 59% (10/17); $p=0,006$). Für die übrigen Stammzell-assoziierten Parameter (CD133, Beta-Catenin, SOX2) sowie für MLH1 und MSH2 konnte kein Expressionsunterschied zwischen den nodal positiven Fällen und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Keiner der untersuchten Marker hatte einen Einfluss auf das Überleben.

Schlussfolgerung:

Der Parameter des extrakapsulären Lymphknotenbefalls (ECG) stellt ein Indiz für eine höhere Tumoraggressivität dar. Patienten mit extrakapsulärem Lymphknotenbefall (ECG) weisen eine schlechtere Prognose auf als Patienten ohne ECG. Die multivariate Cox-Regression zeigt, dass der Parameter ECG beim Magenkarzinom unabhängig vom Tumorstadium Einfluss auf das Überleben hat.

Die Differenzierung nodal positiver Patienten anhand des ECG hat sowohl aus prognostischer als auch aus wissenschaftlicher Sicht Bedeutung. Der Parameter dient als Stratifizierungskriterium („stratification criteria“) um homogene Studiengruppen zu erhalten.

Entgegen der Erwartung konnte nur für SOX9 ein Expressionsunterschied in den Gruppen mit und ohne extrakapsulärem Wachstum festgestellt werden. Diese Assoziation deutet jedoch darauf hin, dass sich Tumore mit ECG tumorbiologisch unterscheiden. Es sind daher weitergehende Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene erforderlich, um diese Tumortypen besser charakterisieren zu können.

8 Literatur

1. Prof. Dr. M. K. Angele, P.D.C.J.A., Dr. A. Beraldi, PD Dr. R. Gertler, Prof. Dr. V. Heinemann, PD Dr. A. Jung, Dr. E.-M. Kalusche, PD Dr. G. Keller, Dr. A. Kleespies, Prof. Dr. F.T. Kolligs, Prof. Dr. T. Licht, Prof. Dr. H. Lindner, PD Dr. M. E. Martignoni, Dr. M. Schlemmer, Prof. Dr. R. M. Schmid, PD Dr. J. T. Siveke, Prof. Dr. W. E. Thasler, PD Dr. J. Theisen, Dr. T. Weiglein, *Manual Gastrointestinale Tumoren in Gastrointestinale Tumoren* P.D.C.J. Bruns, Editor. 2013, Tumorzentrum München W. Zuckschwerdt Verlag München p. 24-61.
2. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(2): p. 87-108.
3. Herold, G., *Innere Medizin Eine vorlesungsorientierte Darstellung*. 2014: p. 447-450.
4. <http://www.tumorregister-muenchen.de>. Tumorregister München (TRM).
5. Möhler, M., Al-Batran, S-E., Andus, T., Anthuber, M., Arends, J., Arnold, D., Aust, D., Baier, P. Baretton *Diagnostik und Therapie der Adenokarzinome des Magens und ösophagogastralen Übergangs*. Leitlinienprogramm Onkologie 02.2012.
6. Correa, P., *A human model of gastric carcinogenesis*. Cancer Res, 1988. **48**(13): p. 3554-60.
7. Nguyen, L.T., et al., *Helicobacter pylori virulence and the diversity of gastric cancer in Asia*. J Med Microbiol, 2008. **57**(Pt 12): p. 1445-53.
8. Scholte, G.H., et al., *Genotyping of Helicobacter pylori in paraffin-embedded gastric biopsy specimens: relation to histological parameters and effects on therapy*. Am J Gastroenterol, 2002. **97**(7): p. 1687-95.
9. Lee, I.S., et al., *Impact of extranodal extension on prognosis in lymph node-positive gastric cancer*. Br J Surg, 2014. **101**(12): p. 1576-84.
10. Veronese, N., et al., *Prognostic impact and implications of extracapsular lymph node involvement in colorectal cancer: a systematic review with meta-analysis*. Ann Oncol, 2016. **27**(1): p. 42-8.
11. Wind, J., et al., *A systematic review on the significance of extracapsular lymph node involvement in gastrointestinal malignancies*. Eur J Surg Oncol, 2007. **33**(4): p. 401-8.
12. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma*. Nature, 2014. **513**(7517): p. 202-9.
13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/emedien.ub.uni-muenchen.de/gene/3717>.
14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/emedien.ub.uni-muenchen.de/gene/29126>.
15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/emedien.ub.uni-muenchen.de/gene/387>.
16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157>.
17. Gonzalez, R.S., et al., *Immunohistochemistry as a Surrogate for Molecular Subtyping of Gastric Adenocarcinoma*. Hum Pathol, 2016.
18. Yiming, L., et al., *CD133 overexpression correlates with clinicopathological features of gastric cancer patients and its impact on survival: a systematic review and meta-analysis*. Oncotarget, 2015. **6**(39): p. 42019-27.
19. Yu, Z., et al., *Cancer stem cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(12): p. 2144-51.
20. Yang, Y., et al., *Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotype induced by Twist1 contribute to acquired resistance to irinotecan in colon cancer*. Int J Oncol, 2017.
21. Izumi, D., et al., *Colorectal Cancer Stem Cells Acquire Chemoresistance through the Upregulation of FBXW7 and the Consequent Degradation of c-Myc*. Stem Cells, 2017.
22. Kodama, H., et al., *Prognostic impact of CD44-positive cancer stem-like cells at the invasive front of gastric cancer*. Br J Cancer, 2017. **116**(2): p. 186-194.
23. Durko, L., et al., *Expression and Clinical Significance of Cancer Stem Cell Markers CD24, CD44, and CD133 in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Chronic Pancreatitis*. Dis Markers, 2017. **2017**: p. 3276806.
24. Brungs, D., et al., *Gastric cancer stem cells: evidence, potential markers, and clinical implications*. J Gastroenterol, 2015.

25. Vermeulen, L., et al., *The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities*. Lancet Oncol, 2012. **13**(2): p. e83-9.
26. Mathiak, M., et al., *Clinicopathologic Characteristics of Microsatellite Instable Gastric Carcinomas Revisited: Urgent Need for Standardization*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2015.
27. Feng, L., et al., *LMX1A inhibits metastasis of gastric cancer cells through negative regulation of beta-catenin*. Cell Biol Toxicol, 2016. **32**(2): p. 133-9.
28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/emedien.ub.uni-muenchen.de/gene/6657>.
29. Chen, Y., et al., *SOX2 inhibits metastasis in gastric cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2016. **142**(6): p. 1221-30.
30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/emedien.ub.uni-muenchen.de/gene/6662>.
31. Shao, C.M., et al., *[Association of SOX9 expression and prognosis in patients with gastric cancer]*. Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi, 2012. **15**(7): p. 736-9.
32. Kolodner, R.D. and G.T. Marsischky, *Eukaryotic DNA mismatch repair*. Curr Opin Genet Dev, 1999. **9**(1): p. 89-96.
33. Lynch, H.T. and A. de la Chapelle, *Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer*. J Med Genet, 1999. **36**(11): p. 801-18.
34. Jiricny, J., *DNA Reparatur Molekulare Zellbiologie FS2011 , Medizin – 1. Studienjahr Bachelor*
1. März 2013 p. 34.
35. Kikuchi, A., et al., *New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation*. Int Rev Cell Mol Biol, 2011. **291**: p. 21-71.
36. Cho, S.J., et al., *Evolutionary dynamics of the wnt gene family: a lophotrochozoan perspective*. Mol Biol Evol, 2010. **27**(7): p. 1645-58.
37. Rao, T.P. and M. Kuhl, *An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more*. Circ Res, 2010. **106**(12): p. 1798-806.
38. Logan, C.Y. and R. Nusse, *The Wnt signaling pathway in development and disease*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. **20**: p. 781-810.
39. MacDonald, B.T., K. Tamai, and X. He, *Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases*. Dev Cell, 2009. **17**(1): p. 9-26.
40. Kim, J.H., et al., *Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases*. Ther Adv Musculoskelet Dis, 2013. **5**(1): p. 13-31.
41. Chiurillo, M.A., *Role of the Wnt/beta-catenin pathway in gastric cancer: An in-depth literature review*. World J Exp Med, 2015. **5**(2): p. 84-102.
42. Hu, T. and C. Li, *Convergence between Wnt-beta-catenin and EGFR signaling in cancer*. Mol Cancer, 2010. **9**: p. 236.
43. Wang, H.S., et al., *Downregulation of human Wnt3 in gastric cancer suppresses cell proliferation and induces apoptosis*. Onco Targets Ther, 2016. **9**: p. 3849-60.
44. Song, X., et al., *Wnt/beta-catenin, an oncogenic pathway targeted by H. pylori in gastric carcinogenesis*. Oncotarget, 2015. **6**(34): p. 35579-88.
45. Miraglia, S., et al., *A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning*. Blood, 1997. **90**(12): p. 5013-21.
46. Singh, S.K., et al., *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. Cancer Res, 2003. **63**(18): p. 5821-8.
47. Singh, S.K., et al., *Identification of human brain tumour initiating cells*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 396-401.
48. Ong, C.W., et al., *CD133 expression predicts for non-response to chemotherapy in colorectal cancer*. Mod Pathol, 2010. **23**(3): p. 450-7.
49. Ben-Porath, I., et al., *An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors*. Nat Genet, 2008. **40**(5): p. 499-507.
50. Nakagawa, M., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(1): p. 101-6.

51. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
52. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
53. Sarkar, A., et al., *Sox2 Suppresses Gastric Tumorigenesis in Mice*. Cell Rep, 2016.
54. Bass, A.J., et al., *SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas*. Nat Genet, 2009. **41**(11): p. 1238-42.
55. Hussenet, T. and S. du Manoir, *SOX2 in squamous cell carcinoma: amplifying a pleiotropic oncogene along carcinogenesis*. Cell Cycle, 2010. **9**(8): p. 1480-6.
56. Riggi, N., et al., *EWS-FLI-1 modulates miRNA145 and SOX2 expression to initiate mesenchymal stem cell reprogramming toward Ewing sarcoma cancer stem cells*. Genes Dev, 2010. **24**(9): p. 916-32.
57. Kong, D., et al., *Epithelial to mesenchymal transition is mechanistically linked with stem cell signatures in prostate cancer cells*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12445.
58. Carrasco-Garcia, E., et al., *Paradoxical role of SOX2 in gastric cancer*. Am J Cancer Res, 2016. **6**(4): p. 701-13.
59. Lee, M.J., et al., *Sox2 contributes to tooth development via Wnt signaling*. Cell Tissue Res, 2016. **365**(1): p. 77-84.
60. Kormish, J.D., D. Sinner, and A.M. Zorn, *Interactions between SOX factors and Wnt/beta-catenin signaling in development and disease*. Dev Dyn, 2010. **239**(1): p. 56-68.
61. Chen, Y., et al., *The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer*. J Biol Chem, 2008. **283**(26): p. 17969-78.
62. Jo, A., et al., *The versatile functions of Sox9 in development, stem cells, and human diseases*. Genes Dis, 2014. **1**(2): p. 149-161.
63. Bastide, P., et al., *Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium*. J Cell Biol, 2007. **178**(4): p. 635-48.
64. Guo, W., et al., *Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state*. Cell, 2012. **148**(5): p. 1015-28.
65. Katoh, M., *Epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer (Review)*. Int J Oncol, 2005. **27**(6): p. 1677-83.
66. Wu, C., et al., *Interaction between Wnt/beta-catenin pathway and microRNAs regulates epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer (Review)*. Int J Oncol, 2016. **48**(6): p. 2236-46.
67. Hong, Y., et al., *Upregulation of sex-determining region Y-box 9 (SOX9) promotes cell proliferation and tumorigenicity in esophageal squamous cell carcinoma*. Oncotarget, 2015. **6**(31): p. 31241-54.
68. Lu, B., et al., *Analysis of SOX9 expression in colorectal cancer*. Am J Clin Pathol, 2008. **130**(6): p. 897-904.
69. Zhou, C.J., et al., *Elevated expression of SOX9 is related with the progression of gastric carcinoma*. Diagn Cytopathol, 2011. **39**(2): p. 105-9.
70. Veronese, N., et al., *Prognostic impact of extra-nodal extension in thyroid cancer: A meta-analysis*. J Surg Oncol, 2015. **112**(8): p. 828-33.
71. Luchini, C., et al., *Prognostic implications of extranodal extension in node-positive squamous cell carcinoma of the vulva: A systematic review and meta-analysis*. Surg Oncol, 2016. **25**(1): p. 60-5.
72. Nottegar, A., et al., *Extra-nodal extension of sentinel lymph node metastasis is a marker of poor prognosis in breast cancer patients: A systematic review and an exploratory meta-analysis*. Eur J Surg Oncol, 2016. **42**(7): p. 919-25.
73. Luchini, C., et al., *Extranodal extension of lymph node metastasis is a marker of poor prognosis in oesophageal cancer: a systematic review with meta-analysis*. J Clin Pathol, 2016.
74. Tapia, E.O., et al., *[Prognostic value of extracapsular lymph node involvement among patients with gastric cancer]*. Rev Med Chil, 2011. **139**(8): p. 992-7.

75. Yu, C.C., et al., *Pathological prognostic factors in the second British Stomach Cancer Group trial of adjuvant therapy in resectable gastric cancer*. Br J Cancer, 1995. **71**(5): p. 1106-10.
76. Bauer, L., et al., *Expression profiling of stem cell-related genes in neoadjuvant-treated gastric cancer: a NOTCH2, GSK3B and beta-catenin gene signature predicts survival*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e44566.
77. Du, X.M., et al., *Prognostic value of Sox2 expression in digestive tract cancers: A meta-analysis*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2016. **36**(3): p. 305-12.
78. An, C., et al., *Prognostic significance of CpG island methylator phenotype and microsatellite instability in gastric carcinoma*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(2 Pt 1): p. 656-63.
79. Hu, G., et al., *Epigenetic Silencing of the MLH1 Promoter in Relation to the Development of Gastric Cancer and its use as a Biomarker for Patients with Microsatellite Instability: a Systematic Analysis*. Cell Physiol Biochem, 2018. **45**(1): p. 148-162.
80. Lydiatt, W.M., et al., *Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual*. CA Cancer J Clin, 2017. **67**(2): p. 122-137.
81. Hornig D, H.P., Gall FP, *The Significance of the Extent of Proximal Margins of Clearance in Gastric Cancer Surgery*. Scnad J Gastroenterol1987(22): p. 69-71.
82. P., H., *pTNM and residual tumor classifications: problems of assessment and prognostic significance*. . World J Surg, 1995, Mar-Apr;19(2).
83. Bozzetti, F., et al., *Total versus subtotal gastrectomy: surgical morbidity and mortality rates in a multicenter Italian randomized trial. The Italian Gastrointestinal Tumor Study Group*. Ann Surg, 1997. **226**(5): p. 613-20.
84. Cunningham, D., et al., *Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer*. N Engl J Med, 2006. **355**(1): p. 11-20.
85. Link, H., et al., *Extra-capsular growth of lymph node metastasis correlates with poor prognosis and high SOX9 expression in gastric cancer*. BMC Cancer, 2018. **18**(1): p. 483.

9 Eigene Veröffentlichungen

Link, H., et al., *Extra-capsular growth of lymph node metastasis correlates with poor prognosis and high SOX9 expression in gastric cancer*. BMC Cancer, 2018 [85].

10 Abkürzungen

°

°C *Grad Celsius*

5

5FU *5-Fluorouracil*

A

A.dest *Aqua destilliert*

Abb. *Abbildung*

AEG *Adenocarcinoma of the Esophagogastric Junction*

AWMF *Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften*

C

ca *circa*

CC1 *Cell Conditioner 1*

CD133 *Cluster of Differentiation 133*

CDH1 *Cadherin-1*

CDKN2A *cyclin dependent kinase inhibitor 2A*

CIMP *CpG Island Methylator Phenotype*

CIN *chromosomal instability*

CSC *Cancer Stem Cells, Cancer Stem Cell*

D

DNA *Desoxyribonukleinsäure*

Dvl *Dishevelled*

E

EBV *Epstein Barr Virus*

ECF *Epirubicin-Cisplatin-5-Fluorouracil*

ECG *Extra Capsular Growth*

EGFR *epidermal growth factor receptor*

ERBB2/3 *erb-b2 receptor tyrosine kinase 2/3*

EXO1 *Exonuklease 1*

F

FAP *Familiäre Adenomatöse Polyposis*

Fzd *Frizzled*

G

g *Gramm*

G *Grading*

GS *genetic stable*

H

H.pylori *Helicobacter pylori*

H₂O₂ *Wasserstoffperoxid*

HER-2 *human epidermal growth factor receptor 2*

HNPCC *hereditary non-polyposis colorectal cancer*

I

ICG *Intracapsular growth*

J

JAK2 *Janus Kinase 2*

L

l *Liter*

L *Lymphangiosis carcinomatosa*

LAD *Lymphadenektomie*

Lef *lymphoid enhancer-binding factor*

LK *Lymphknoten*

LRP- *low-density lipoprotein receptor-related protein*

M

M *Metastase*

min *Minuten*

MLH1 *MutL homolog 1*

MMR *Mismatch Repair*

MSH2 *MutS protein homolog 2*

MSI *Mikrosatelliteninstabilität*

N

N *Nodus*

NaCl *Natrium Chlorid*

Nr. *Nummer*

P

PD-L1 *Programmed cell death 1 ligand*

PD-L2 *Programmed cell death 1 ligand 2*

PIK3CA *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*

PPARδ *peroxisome proliferator-activated receptor*

PTEN *phosphatase and tensin homolog*

R

R *Resektionsrand*

RHOA *Ras homolog gene family, member A*

RTK *Rezeptor-Tyrosinkinase*

S

sec *Sekunden*

SOX2 *(sex determining region Y)-box 2*

SOX9 *SRY-Box 9*

T

T *Tumor*

Tcf *T-cell factor*

TCGA *The Cancer Genome Atlas Project*

TP53 *Tumor Protein p53*

U

u *Ultraschall*

u.a. *unter anderem*

UICC *Union International Contre Cancer*

V

vgl. *vergleiche*

11 Abbildungen

| | |
|--|-----------|
| Abb. 1 [12]: Besonderheiten der Magenkarzinom-Subtypen. Das Schema stellt die wichtigsten Merkmale der vier molekularen Subtypen nach dem TCGA-Projekt dar. Die Verteilung der Subtypen nach der Lokalisation im Magen ist anhand der Kreisdiagramme dargestellt. | 10 |
| Abb. 2 [34]: MSH2 bildet zusammen mit MSH6 den Mismatch-Erkennungskomplex. Dieser bindet am Fehlpaar und rekrutiert MLH1 und PMS2. Der Komplex wandert dann an der DNA entlang, bis er eine Strangdiskontinuität im neu-synthetisierten Tochterstrang erkennt. EXO1 wird rekrutiert, anschließend wird der Tochterstrang bis nach dem falsch eingebauten Nukleotid abgebaut. Die Lücke wird anschließend regulär von der DNA-Polymerase δ aufgefüllt und die Enden durch die DNA-Ligase verknüpft. | 12 |
| Abb. 3[40]: Wnt-Signalweg. Active: Ist der Wnt-Ligand am Frizzled (Fzd)-Rezeptor und an einem der Corezeptoren LRP5/6 gebunden, wird ‚Dishevelled‘ (Dvl) aktiviert, welches folglich GSK3β inhibiert. β-Catenin wird nicht phosphoryliert und reichert sich intrazellulär an. Es wird dadurch in den Zellkern überführt, wo es zusammen mit den Transkriptionsfaktoren Lef und Tcf die Expression der Zielgene antreibt. Inactive: Bei abwesendem Wnt-Liganden phosphoryliert GSK3β β-Catenin stetig, was zur Ubiquitinierung und zum proteosomalen Abbau von Beta-Catenin führt. Folglich werden die Zielgene geringer exprimiert [40]. | 13 |
| Abb. 4: Überblick über die Reihenfolge der wichtigsten Arbeitsschritte mit Fallzahlangaben. | 18 |
| Abb. 5: Geschlechterverteilung der nodal positiven Fälle. Weiblich (n=71; 36%), Männlich (n=128; 64%). Gesamtkollektiv (n=199). | 21 |
| Abb. 6: Differenzierung der nodal positiven Fälle (n=199) in Magenkarzinom (n=191, 96%) und AEG-Tumor (n=8; 4%). | 21 |
| Abb. 7: Differenzierte Darstellung der Tumorlokalisation. Antrum (n=31), Korpus (n=33), Kardia (n=68), Fundus (n=5), Magen-Sonstiges (n=54), AEG (n=8). Gesamtkollektiv (n=199). | 21 |
| Abb. 8: Überblick über die Anteile der drei Untergruppen nach der Lauren-Klassifikation. Intestinaler Typ (n=108, 54%), diffuser Typ (n=69, 35%), Mischtyp (n=22, 11%). Gesamtkollektiv (n=199). | 22 |
| Abb. 9: Überblick über die Anteile der T-Kategorien. T0 (n=4; 2%), T1 (n=2; 4%), T2 (n=97; 49%), T3(n=61; 31%), T4(n=34; 17%). Gesamtkollektiv (n=198), von einem Patienten konnte retrospektiv kein T-Stadium eruiert werden (Tx=1, nicht dargestellt). | 23 |
| Abb. 10: Überblick über die Anteile der N-Kategorien. N1 (n=89; 45%), N2 (n=59; 30%), N3 (n=51; 25%). Gesamtkollektiv (n=199). | 23 |
| Abb. 11: Überblick über den Anteil der Patienten mit Fernmetastasen. M0 (n=127; 68%), M1 (n=59; 32%). Gesamtkollektiv (n=186), von 13 Patienten konnte retrospektiv kein M-Status evaluiert werden Mx (n=13, nicht dargestellt). | 23 |
| Abb. 12: Überblick über die Verteilung nach UICC-Stadien. I (n=1; 1%), II (n=75; 41%), III (n=48; 26%), IV (n= 59; 32%). Gesamtkollektiv (n=183). Von 16 Patienten konnten retrospektiv nicht alle relevanten Informationen eruiert werden oder waren nach neoadjuvanter Chemotherapie postoperativ als T0 klassifiziert UICC X (n=16, nicht dargestellt). | 23 |
| Abb. 13: Anteil der neoadjuvant vorththerapierten Patienten am Gesamtkollektiv (n=199). vorththerapiert (n=59; 29,6%), nicht vorththerapiert (n= 140; 70,4%). | 24 |

| | |
|--|-----------|
| Abb. 14: Ansprechen der nodal positiven, vorthera-pierten Patienten auf die Chemotherapie in Form des Regressionsgrades n. Becker. 1a (n=5), 1b (n=8), 2 (n=19), 3 (n=26). Gesamtkollektiv (n=59). | 24 |
| Abb. 15: Überblick über den Anteil mit extrakapsulären Lymphknotenmetastasen. ECG= extrakapsuläres Wachstum, ICG= rein intrakapsuläres Wachstum. ECG (n=73; 37%), ICG (n=126; 63%). Gesamtkollektiv (n=199). f..... | 25 |
| Abb. 16: Überblick über den Anteil mit extrakapsulären Lymphknotenmetastasen, differenziert in kleinherdigen und großflächigen Kapseldurchbruch. ECG= extrakapsuläres Wachstum, ICG= rein intrakapsuläres Wachstum. kleinherdiges ECG (n=11; 6%), großflächiges ECG (n=62; 31%), ICG (n=126; 63%). Gesamtkollektiv (n=199)..... | 25 |
| Abb. 17: LK-Präparate ohne (a,b) und mit (c,d) vorhandenen Kapseldurchbruch. a: LK ohne Kapseldurchbruch in 25- facher Vergrößerung b: LK in 100-facher Vergrößerung ohne ECG. c, d: Derselbe LK in 25- und 100-facher Vergrößerung mit ausgeprägtem Kapseldurchbruch in das perinodale Fettgewebe..... | 26 |
| Abb. 18: Magenkarzinom: kumulatives Überleben nach N-Stadien. N1 (n=88; 44,9%), N2 (n=58; 29,6%), N3 (n= 50; 25,5%). Gesamtkollektiv n=196. | 32 |
| Abb. 19: Magenkarzinom: Kumulatives Überleben nodal positiver Fälle nach T-Stadien. T0, T1 und T2 wurden zusammengefasst. T0-2 (n=103; 52,8%), T3 (n=60;30,8%), T4 (n=33; 16,9%). Gesamtkollektiv: n=195. | 33 |
| Abb. 20: Magenkarzinom. Kumulatives Überleben nodal positiver Fälle nach UICC-Stadien. UICC I und II wurden zusammengefasst. UICC I-II (n=77; 42,3%), UICC III (n=47; 25,8%), UICC IV (n=58; 31,9%). Gesamtkollektiv: n=182. | 34 |
| Abb. 21: Magenkarzinom. Kumulatives Überleben nodal positiver Fälle nach Vorhandensein eines Kapseldurchbruchs befallener Lymphknoten. ECG= extrakapsulärer Lymphknotenbefall, ICG= ausschließlich intrakapsulärer LK-Befall. ECG (n=72; 36,7%), ICG (n=124; 63,3%). | 35 |
| Abb. 22: Magenkarzinom. Kumulatives Überleben nodal positiver, als UICC III-klassifizierte Fälle, ECG= extrakapsulärer Lymphknotenbefall, ICG= ausschließlich intrakapsulärer LK-Befall. ECG (n=25;53%), ICG (n=22;47%). Gesamtkollektiv UICC 3 (n=47)..... | 36 |
| Abb. 23: Magenkarzinom. Kumulatives Überleben nodal positiver, als UICC II-klassifizierte Fälle, ECG= extrakapsulärer Lymphknotenbefall, ICG= ausschließlich intrakapsulärer LK-Befall. ECG (n=16;21%), ICG (n=60;79%). Gesamtkollektiv UICC II (n=76). | 37 |
| Abb. 24: Überblick über die prozentuale Verteilung des extrakapsulären Wachstums in Abh. vom T-Stadium. ECG= extrakapsuläres Wachstum, ICG= intrakapsuläres Wachstum. T1 (n=2; 1%), T2(n=97; 50,0%), T3 (n=61; 31,5%), T4 (n=34; 17,5%). Gesamtkollektiv (n=194). | 38 |
| Abb. 25: Überblick über die prozentuale Verteilung des extrakapsulären Wachstums in Abh. vom N-Stadium. ECG= extrakapsuläres Wachstum, ICG= intrakapsuläres Wachstum. N1 (n=89; 44,8%), N2 (n=59; 29,6%), N3 (n=51; 25,6%). Gesamtkollektiv (n=199). | 38 |
| Abb. 26: Überblick über die prozentuale Verteilung des extranodalen Wachstums in Abh. Vom M-Stadium. ECG= extrakapsuläres Wachstum, ICG= intrakapsuläres Wachstum. M0 (n=126; 68,5%), M1 (n=58; 31,5%). Gesamtkollektiv (n=184). | 39 |
| Abb. 27: Überblick über die prozentuale Verteilung des extranodalen Wachstums in Abh. vom Vorhandensein einer Lymphangiome. ECG= extrakapsuläres Wachstum, ICG= intrakapsuläres Wachstum. L0 (n=56; 28,1%), L1 (n=143; 71,9%). Gesamtkollektiv (n=199). | 39 |
| Abb. 28: Überblick über die prozentuale Verteilung des extranodalen Wachstums in Abh. vom Grading des Tumors. ECG= extrakapsuläres Wachstum, ICG= intrakapsuläres Wachstum. G2 (n=31; 16,1%), G3 (n=162; 83,9%). Gesamtkollektiv (n=193)..... | 40 |

| | |
|---|-----------|
| Abb. 29: Überblick über die prozentuale Verteilung des extranodalen Wachstums in Abh. vom Resektionsrand (R-Stadium) des Tumors. ECG= extrakapsuläres Wachstum, ICG= intrakapsuläres Wachstum. R0(n=118; 74,7%), R1 (n=35; 22,2%), R2 (n=5; 3,1%)Gesamtkollektiv (n=158). | 40 |
| Abb. 30: Überblick über die prozentuale Verteilung des extranodalen Wachstums in Abh. von der Lauren-Klassifikation. ECG= extrakapsuläres Wachstum, ICG= intrakapsuläres Wachstum. Intestinaler Typ (n=108; 54,2%), diffuser Typ (n=69; 34,7%), Mischtyp (n=22; 11,1%). Gesamtkollektiv (n=199). | 41 |
| Abb. 31: Überblick über die Verteilung des extrakapsulären Wachstums bei den vorthera-pierten Patienten in Abhängigkeit vom Regressionsgrad n. Becker. 1a (n=5), 1b (n=8), 2 (n=19), 3 (n=26). Gesamtkollektiv (n=58). Aufgrund der geringen Fallzahl kann die prozentuale Angabe nur als Tendenz gewertet werden. | 42 |
| Abb. 32: Nodal positive Fälle. Verteilung der als MLH1 positiv und negativ gewerteten Fälle. MLH1 negativ (n=19; 10%), MLH1 positiv (n=175; 90%). Gesamtkollektiv (n=194). | 42 |
| Abb. 33: Kontrollgruppe. Verteilung der als MLH1 positiv und negativ gewerteten Fälle. MLH1 negativ (n=3; 20%), MLH1 positiv (n=12; 80%). Gesamtkollektiv (n=15). | 42 |
| Abb. 34: MLH1-positiver Fall in 20-facher Vergrößerung. Man erkennt die drüsig formierten Tumorzellen, deren Zellkerne durch den MLH1 Antikörper tief braun angefärbt wurden. .. | 43 |
| Abb. 35: MLH1-negativer Fall in 20-facher Vergrößerung. Man erkennt die durch die Gegenfärbung blau angefärbten Tumorzellen und die MLH1 positiven interstitiellen Lymphozyten, welche in den negativen Fällen als endogene Kontrolle dienen. | 43 |
| Abb. 36: Alle 194 nodal positiven Fälle wurden als MSH2 positiv gewertet (n=194). | 44 |
| Abb. 37: Kontrollgruppe. Alle 16 Fälle exprimierten MSH2 (n=16). | 44 |
| Abb. 38: MSH2 positiver Fall in 20-facher Vergrößerung. Man erkennt die braun angefärbten diffus im Interstitium verteilten Tumorzellkerne. | 44 |
| Abb. 39: Ergebnis der β -Catenin IHC: β -Catenin ‚low positive‘ (n=187; 96%), β -Catenin ‚high positive‘ (n=7; 4%). Gesamtkollektiv (n=194). | 45 |
| Abb. 40: Ergebnis der β -Catenin IHC: β -Catenin ‚low positive‘ (n=12; 92%), β -Catenin ‚high positive‘ (n=1; 8%). Gesamtkollektiv (n=13). | 45 |
| Abb. 41: β- Catenin negativer Fall in 20-facher Vergrößerung. Die Karzinomzellen sind nukleär nicht angefärbt (blaue Zellkerne). Die erkennbare membranständige Anfärbung dient als endogene Kontrolle. | 46 |
| Abb. 42: β-Catenin positives Karzinom mit mehr als 90% positiven Tumorzellen (high grade) in 20-facher (c) Vergrößerung. | 46 |
| Abb. 43: Verteilung der in der CD133 IHC als ‚low‘ und ‚high‘ positive bewerteten Fälle. ‚low positive‘ (n= 32; 16%), ‚high positive‘ (n= 162; 84%). Gesamtkollektiv (n=194). | 47 |
| Abb. 44: Kontrollgruppe. Verteilung der in der CD133 IHC als ‚low‘ und ‚high‘ positive bewerteten Fälle. ‚low positive‘ (n= 15), ‚high positive‘ (n= 2). Gesamtkollektiv (n=17). | 47 |
| Abb. 45: CD133 positives Karzinom mit weniger als 50% positiven Tumorzellen in 20-facher Vergrößerung. | 48 |
| Abb. 46: CD133 positives Karzinom mit mehr als 50% positiven Tumorzellen in 20-facher Vergrößerung. | 48 |
| Abb. 47: Anteil der als SOX2-positiv und negativ gewerteten Fälle. SOX2 positiv (n= 74; 38%), SOX2 negativ (n=120; 62%), Gesamtkollektiv (n=194). | 49 |
| Abb. 48: Anteil der als SOX2-positiv und negativ gewerteten Fälle. SOX2 positiv (n= 7; 41%), SOX2 negativ (n=10; 59%), Gesamtkollektiv (n=17). | 49 |
| Abb. 49: SOX2-negativer Fall in 20-facher Vergrößerung. Die drüsig formierten Tumorzellen sind durch die Gegenfärbung blau angefärbt. Als endogene Kontrolle dienen die braun angefärbten Lymphozyten in der linken unteren Ecke. | 50 |

| | |
|--|-----------|
| <i>Abb. 50: SOX2-positiver Fall in 20-facher Vergrößerung. Die drüsig formierten Tumorzellen sind braun angefärbt.</i> | <i>50</i> |
| <i>Abb. 51: Anteil der nodal positiven, als SOX9-stark (high) und schwach (low) positiv gewerteten Fälle. SOX9 ‚high positive‘ (n= 165; 85%), SOX9 ‚low positive‘ (n=29; 15%), Gesamtkollektiv (n=194).</i> | <i>51</i> |
| <i>Abb. 52: Anteil der in der Kontrollgruppe als SOX9-stark (high) und schwach (low) positiv gewerteten Fälle. SOX9 ‚high positive‘ (n= 10; 59%), SOX9 ‚low positive‘ (n=7; 41%), Gesamtkollektiv (n=17).</i> | <i>51</i> |
| <i>Abb. 53: SOX9-positiver Fall mit weniger als 30% positiven Tumorzellen (‚low grade positive‘) in 20-facher Vergrößerung.....</i> | <i>52</i> |
| <i>Abb. 54: SOX9-positiver Fall mit mehr als 30% positiven Tumorzellen (‚high grade positive‘) in 20-facher Vergrößerung.....</i> | <i>52</i> |
| <i>Abb. 55: Verteilung der als MLH1 positiv und negativ gewerteten Fälle bei den nodal positiven Fällen und der Kontrollgruppe. Nodal Positive Fälle: MLH1 negativ (n=19; 10%), MLH1 positiv (n=175; 90%). Kontrollgruppe: MLH1 negativ (n=3;20%), MLH1 positiv (n=12; 80%). Gesamtkollektiv (n=209).</i> | <i>53</i> |
| <i>Abb. 56: Überblick über die Verteilung der MLH1 IHC-Ergebnisse in Abhängigkeit vom ECG. ECG= extrakapsuläres Lymphknotenwachstum, ICG= ausschließlich intrakapsuläres LK-Wachstum. Es konnte kein signifikanter Unterschied der MLH1-Expression in der ECG-, ICG- und Kontrollgruppe festgestellt werden.</i> | <i>53</i> |
| <i>Abb. 57: Magenkarzinom. Kumulatives Überleben nodal positiver Fälle in Abhängigkeit der MLH1-Expression. MLH1 negativ (n=21; 11 Ereignisse, 10 Zensierungen), MLH1 positiv (n=185; 126 Ereignisse, 59 Zensierungen). Gesamtkollektiv (n=206, 137 Ereignisse, 69 Zensierungen).</i> | <i>54</i> |
| <i>Abb. 58: Darstellung des Ergebnisses der IHC für MSH2. Sowohl die nodal positiven Fälle (n=194) als auch die Kontrollgruppe (n=16) wurden als MSH2-positiv bewertet.....</i> | <i>55</i> |
| <i>Abb. 59: Verteilung der als β-Catenin ‚high-‘ und ‚low positive‘ gewerteten Fälle. Nodal positive Fälle (n=194): β-Catenin ‚low positive‘ (n=187; 96%), β-Catenin ‚high positive‘ (n=7; 4%). Kontrollgruppe: ‚low positive‘ (n=12), ‚high positive‘ (n=1).</i> | <i>56</i> |
| <i>Abb. 60: β-Catenin Expression in Abhängigkeit vom ECG. ECG= extrakapsuläres Lymphknotenwachstum, ICG= ausschließlich intrakapsuläres LK-Wachstum. Es konnte kein signifikanter Unterschied in den Gruppen festgestellt werden.</i> | <i>56</i> |
| <i>Abb. 61: Magenkarzinom. Kumulatives Überleben nodal positiver Fälle in Abhängigkeit der β-Catenin-Expression. β-Catenin ‚low-positive‘ (n=196; 132 Ereignisse, 64 Zensierungen), β-Catenin ‚high-positive‘ (n=8; 5 Ereignisse, 3 Zensierungen). Gesamtkollektiv (n=204, 137 Ereignisse, 67 Zensierungen).</i> | <i>57</i> |
| <i>Abb. 62: Verteilung der als CD133 ‚high-‘ und ‚low positive‘ gewerteten Fälle in den nodal positiven Fällen und in der Kontrollgruppe. Nodal positive: CD133 ‚low positive‘ (n=162; 84%), CD133 ‚high positive‘ (n=32; 16%), gesamt (n=194). Kontrollgruppe: ‚low positive‘ (n=15), ‚high positive‘ (n=2), gesamt (n=17).</i> | <i>58</i> |
| <i>Abb. 63: CD133 Expression in Abhängigkeit vom ECG. ECG= extrakapsuläres Lymphknotenwachstum, ICG= ausschließlich intrakapsuläres LK-Wachstum. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der CD133-Expression in den drei Gruppen.....</i> | <i>58</i> |
| <i>Abb. 64: Magenkarzinom. Kumulatives Überleben in Abhängigkeit der CD133-Expression. CD133 ‚low-positive‘ (n=174; 118 Ereignisse, 56 Zensierungen), CD133 ‚high-positive‘ (n=34; 20 Ereignisse, 14 Zensierungen). Gesamtkollektiv (n=208, 138 Ereignisse, 70 Zensierungen)</i> | <i>59</i> |
| <i>Abb. 65: Verteilung der SOX2 negativen und positiven Fälle. nodal positive Fälle: SOX2 negativ (n=120; 62%), SOX2 positiv (n=74; 38%), gesamt (n=194). Kontrollgruppe (n=17): SOX2 negativ (n=10), SOX2 positiv (n=7).</i> | <i>60</i> |

| | |
|---|-----------|
| Abb. 66: SOX2 Expression in Abhängigkeit vom ECG. ECG= extrakapsuläres Lymphknotenwachstum, ICG= ausschließlich intrakapsuläres LK-Wachstum. Die Gruppen unterscheiden sich nicht in Bezug auf die SOX2 Expression. | 60 |
| Abb. 67: Magenkarzinom. Kumulatives Überleben nodal positiver Fälle in Abhängigkeit der SOX2-Expression. SOX2 negativ (n=128; 85 Ereignisse, 43 Zensierungen), SOX2 positiv (n=80; 53 Ereignisse, 27 Zensierungen). Gesamtkollektiv (n=208, 138 Ereignisse, 70 Zensierungen). | 61 |
| Abb. 68: Verteilung der als SOX9 ,high-' und ,low positive' gewerteten Fälle. Nodal positive Fälle (n=194): SOX9 'low positive' (n=29; 15%), SOX9 , high positive' (n=165; 85%). Kontrollgruppe (n=17): 'low positive' (n=7; 41%), 'high positive' (n=10; 59%). Der Anteil der SOX9-Überexpression ist in den nodal positiven Fällen signifikant höher als in der Kontrollgruppe (p=0,006). | 62 |
| Abb. 69: SOX9 Expression in Abhängigkeit vom ECG. ECG= extrakapsuläres Lymphknotenwachstum, ICG= ausschließlich intrakapsuläres LK-Wachstum. SOX9 ,low positive' (n=29), SOX9 ,high positive' (n= 165). ECG (n= 70), ICG (n=124). Gesamtkollektiv (n=194). Die SOX9-Überexpression ist signifikant mit dem Auftreten eines Kapseldurchbruchs assoziiert (p=0,002). | 63 |
| Abb. 70: Magenkarzinom. Kumulatives Überleben nodal positiver Fälle in Abhängigkeit der SOX9-Expression. SOX9 ,low-positive' (n=35; 24 Ereignisse, 11 Zensierungen), SOX9 ,high-positive' (n=173; 114 Ereignisse, 59 Zensierungen). Gesamtkollektiv (n=208, 138 Ereignisse, 70 Zensierungen) | 64 |
| Abb. 71 [5]: Eine D2 Lymphadenektomie umfasst die Lymphknoten aus Kompartiment I (D1, LK Stationen 1-6) sowie die Lymphknoten aus Kompartiment II (LK Stationen 7-11) [5]. ... | 71 |

12 Tabellen

| | |
|--|----|
| Tab. 1: Zusammenhang von TNM- und UICC-Klassifikation beim Magenkarzinom [1]. | 7 |
| Tab. 2: Überblick über die im TGCA-Projekt untersuchten Mutationen, sortiert nach den vier Subtypen des Magenkarzinoms | 9 |
| Tab. 3: Überblick über die in dieser Studie untersuchten Alterationen mit zellulärer Funktion und Rolle beim Magenkarzinom | 11 |
| Tab. 4: Charakterisierung des Patientenkollektivs mit Absolutzahlen und Prozentangaben in Klammern. Die Prozente der Spalte ‚Nodal Positiv‘ beziehen sich stets auf n=199. Die Prozentangaben der Spalten ‚ECG‘ und ‚ICG‘ beziehen sich auf die zeilengleiche Absolutzahl der Spalte ‚Nodal Positiv‘. In der Kontrollgruppe beziehen sich die Prozentangaben stets auf n=27. | 19 |
| Tab. 5.: Überblick über die Tumorlokalisation des Patientenkollektivs mit Absolutzahlen und Prozentangaben in Klammern. | 20 |
| Tab. 6: Überblick über das Ansprechen der vorththerapierten Patienten auf die Chemotherapie in Form des Regressionsgrades n. Becker mit Absolutzahlen und Prozentangaben in Klammern. Die Prozente beziehen sich in der Spalte ‚Vorththerapiert, nodal positiv‘ auf die Gesamtzahl n=59, in den Spalten ‚ECG‘ und ‚ICG‘ auf die zeilengleiche Zahl der Spalte ‚Vorththerapiert, nodal positiv‘ und in der Spalte ‚Kontrollgruppe, vorththerapiert‘ auf die Gesamtzahl n=14. | 20 |
| Tab. 7: Überblick über die in der Immunhistochemie verwendeten Chemikalien mit Herstellerangaben und Katalognummer | 27 |
| Tab. 8: Überblick über die verwendeten Antikörper mit Herkunft, Klonalität, bekannte Speziesreaktivität, Produkt-Nr. und Herstellerangaben | 27 |
| Tab. 9: Überblick über die verwendeten Detektionssysteme mit Konjugat, Produkt-Nr. und Hersteller. | 27 |

13 Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Martin Angele, der mir die Möglichkeit dieser Dissertation eröffnet hat und mich somit an die Grundlagen der klinischen und experimentellen Forschung herangeführt hat.

Desweiteren bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Dr. Jens Neumann für die durchgehend sehr gute und engmaschige Betreuung sowie für die Möglichkeit, einen Teil dieser Arbeit in Form eines Papers zu veröffentlichen.

Eidesstattliche Versicherung

Link, Helena

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Auswirkungen des extranodalen Lymphknotenwachstums beim Magenkarzinom auf die Prognose und dessen Zusammenhang mit molekularen Markern.“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 25.02.2019

Ort, Datum

Helena Link

Unterschrift Doktorandin/Doktorand